

**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**

2022 年度

京都薬科大学大学院 博士課程学位論文

**【薬学】臨床腫瘍学分野**

茂山千愛美

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

1) Chiami Moyama, Mitsugu Fujita, Shota Ando, Keiko Taniguchi, Hiromi Ii, Seisuke Tanigawa, Naoya Hashimoto, Susumu Nakata. Stat5b inhibition blocks proliferation and tumorigenicity of glioblastoma stem cells derived from a de novo murine brain cancer model. *Am. J. Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142. [第 1 章、第 2 章]

なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また、一部未発表データを含んでいる。

## 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程  
氏名 (英字名) : 茂山千愛美 (Chiami Moyama)  
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

### 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/ $\beta$ -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 $\alpha$*  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 $\alpha$*  陽性領域と一致して *Stat5b* の発現が認められたことから、*Hif2 $\alpha$*  が *Stat5b* の発現を制御している可能性を考え、*Hif2 $\alpha$*  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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -Catenin 経路の重要な転写調節因子である  $\beta$ -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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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、Stat5 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/ $\beta$ -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 が減少することを見出した。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。



## 目次

序論.....	1
第1章 低酸素応答シグナルおよび Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路による Stat5b の発現制御機構	
1-1. 緒言.....	10
1-2. 実験方法.....	12
1-2-1. マウス膠芽腫モデルの作製.....	12
1-2-2. 抗体.....	12
1-2-3. 免疫組織化学染色.....	13
1-2-4. 細胞と培養条件.....	14
1-2-5. 定量的リアルタイム PCR (RT-qPCR) 法.....	15
1-2-6. ウェスタンブロッティング法.....	15
1-2-7. shRNA 導入トランスフェクション条件.....	16
1-2-8. フローサイトメーターによる細胞表面タンパク質の検出.....	17
1-2-9. ICG-001 の溶解および添加条件.....	17
1-2-10. 生細胞数の評価.....	18
1-2-11. BrdU 細胞増殖解析.....	18
1-2-12. アポトーシス解析.....	18
1-2-13. 統計学的処理.....	19
1-3. 実験成績.....	20
1-3-1. ヒト膠芽腫組織における Hif2 $\alpha$ /Lgr5/Stat5b の発現解析.....	20
1-3-2. マウス膠芽腫組織における Hif2 $\alpha$ /Lgr5/Stat5b の発現解析.....	22
1-3-3. 膠芽腫幹細胞において低酸素環境における培養条件が Stat5b 発現に与える影響の解析.....	23
1-3-4. 膠芽腫幹細胞における Hif2 $\alpha$ ノックダウンが Stat5b 発現に与える影響の解析.....	24
1-3-5. 低酸素環境による培養条件が膠芽腫幹細胞における Lgr5 発現に与える影響の解析.....	25
1-3-6. 分化誘導した膠芽腫細胞における低酸素刺激が Lgr5 および Stat5b の発現に与える影響の解析.....	27
1-3-7. 膠芽腫幹細胞における Lgr5 ノックダウンによる Stat5b 発現への影響の解析.....	29
1-3-8. Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路阻害剤 ICG-001 による膠芽腫幹細胞の増殖への影響の解析.....	30
1-3-9. Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路阻害剤 ICG-001 による膠芽腫幹細胞のアポトーシス誘導効果と Stat5b 発現に与える影響の解析.....	32
1-4. 考察.....	34
第2章 Stat5b 阻害による膠芽腫幹細胞の増殖抑制機構	
2-1. 緒言.....	36
2-2. 実験方法.....	38

2-2-1. 細胞培養.....	38
2-2-2. shRNA 導入トランスフェクション条件.....	38
2-2-3. 定量的リアルタイム PCR (RT-qPCR) 法.....	38
2-2-4. 抗体.....	38
2-2-5. IQDMA の溶解および添加条件.....	39
2-2-6. ウェスタンブロッティング法.....	39
2-2-7. 生細胞数の評価.....	40
2-2-8. アポトーシス解析.....	40
2-2-9. マイクロアレイ解析とパスウェイ解析.....	40
2-2-10. BrdU 細胞増殖解析.....	41
2-2-11. Caspase 3/7 assay.....	41
2-2-12. 膠芽腫幹細胞のマウス大脳への同所性移植実験.....	41
2-2-13. 生体内発光イメージング.....	41
2-2-14. 免疫組織化学染色.....	42
2-2-15. 統計学的処理.....	42
2-3. 実験成績.....	43
2-3-1. Stat5b ノックダウンによる膠芽腫幹細胞の増殖に与える影響の解析.....	43
2-3-2. Stat5b ノックダウンによる膠芽腫幹細胞のアポトーシス誘導効果の解析.....	45
2-3-3. 膠芽腫幹細胞において Stat5b ノックダウンにより抑制性の影響を受ける経路の同定.....	46
2-3-4. 膠芽腫幹細胞において Stat5b ノックダウンにより発現抑制される細胞周期関連遺伝子の同定.....	47
2-3-5. 膠芽腫幹細胞における Stat5b ノックダウンが細胞周期関連遺伝子の発現に与える影響の解析.....	48
2-3-6. 膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現低下が細胞周期に与える影響の解析.....	49
2-3-7. Stat5 阻害剤 IQDMA による膠芽腫幹細胞の増殖への影響の解析.....	50
2-3-8. Stat5 阻害剤 IQDMA が膠芽腫幹細胞において細胞周期関連遺伝子の発現に与える影響の解析.....	52
2-3-9. Stat5 阻害剤 IQDMA による膠芽腫幹細胞におけるアポトーシスの誘導効果の解析.....	53
2-3-10. マウスアストロサイトに対する Stat5 阻害剤 IQDMA による細胞毒性の解析.....	55
2-3-11. 生体内マウス膠芽腫モデルに対する Stat5 阻害剤 IQDMA による抗腫瘍効果の解析.....	56
2-3-12. 生体内マウス膠芽腫モデルにおいて Stat5b ノックダウンが腫瘍形成能に与える影響の解析.....	57
2-3-13. 生体内マウス膠芽腫モデルにおいて Stat5b ノックダウンが膠芽腫細胞の増殖活性に与える影響の解析.....	59
2-4. 考察.....	61
総括.....	64

謝辭.....	65
引用文献.....	66

## 【略語表】

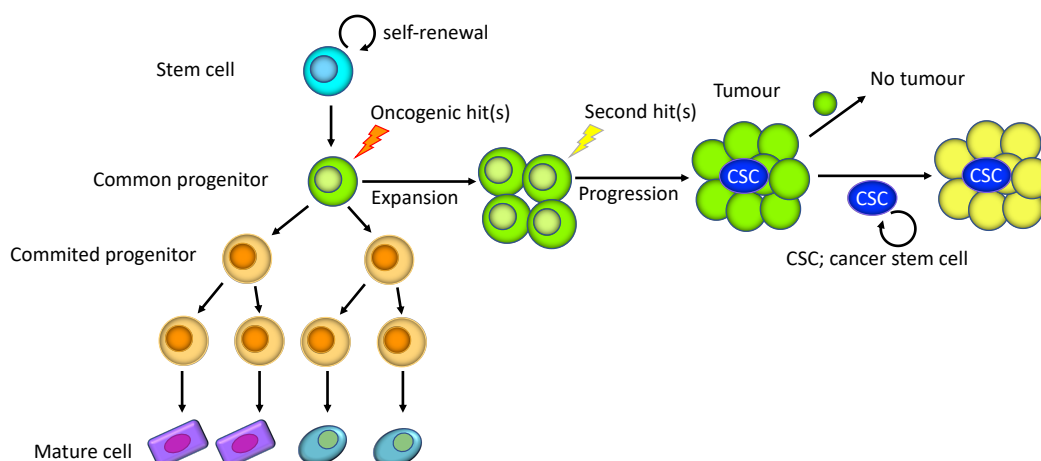
APC	adenomatous polyposis coli
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
BCA	bicinchoninic acid
BLI	bioluminescent intensity
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumin
CDK	cyclin-dependent kinase
CKI	casein kinase I
DAB	3, 3-Diaminobenzidine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Dvl	Dishevelled segment polarity protein
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase
GBM	Glioblastoma
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GPCR	G-protein-coupled receptor
GSC	Glioblastoma stem cell
GSK3 $\beta$	glycogen synthase kinase 3 $\beta$
HEK293T	Human Embryonic Kidney cell 293T
Hif	hypoxia-inducible factor
HRP	horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub>	50% inhibitory concentration
Lef	lymphoid enhancer binding factor
Lgr5	leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LRP	lipoprotein receptor-related protein
MOI	multiplicity of infection
Myb	myeloblastosis oncogene
Oct4	octamer-binding transcription factor 4
PBS	phosphate-buffered saline
PEI	polyethylenimine
PI	propidium iodide
Ptch2	patched 2
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
Rb	Retinoblastoma

SCM	stem cell medium
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	short hairpin RNA
Sox9	SRY-box transcription factor 9
Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5b
TBS	tris-buffered saline
Tcf	T cell factor
TKI	tyrosine kinase inhibitor
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 序論

膠芽腫は成人発症の悪性脳腫瘍において最も頻度が高く、生存期間中央値は約 15 ヶ月と極めて予後不良である (1-3)。膠芽腫の治療として、外科的切除、放射線療法、化学療法を組み合わせた集学的治療が実施されるが、膠芽腫細胞の高い浸潤性により正常脳組織との境界が不明瞭となり、外科的に腫瘍組織を完全に切除することは極めて困難である。また、膠芽腫は術後再発率が極めて高く、一旦再発した症例に対しては、現状ではほとんど治療法は存在しない。第二世代アルキル化薬であるテモゾロミドは、2005 年に Stupp らが発表した成人初発膠芽腫に対するランダム化比較試験の結果 (1) によりその有効性が示されて以降、現在も標準治療薬として用いられているが、いまだテモゾロミドを上回る新規治療薬の開発には至っておらず、臨床的予後の大幅な改善に繋がっていない。

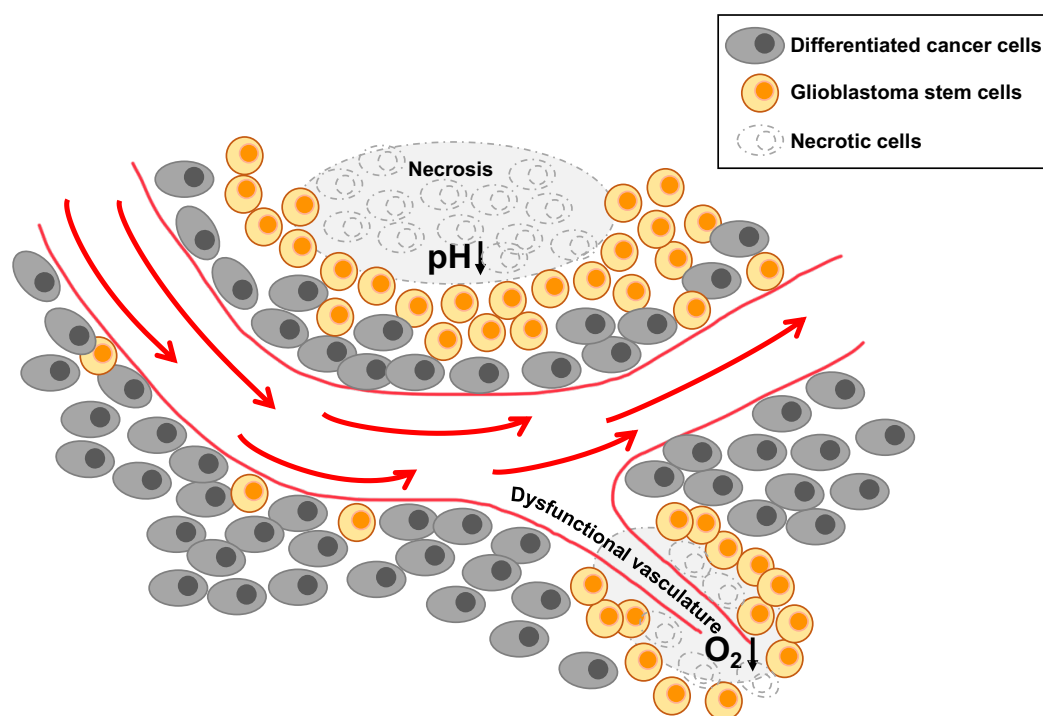
近年、がんの再発・転移の原因としてがん幹細胞の存在が指摘されている。がん幹細胞は正常幹細胞と同様に自己複製能を持つとともに、多分化能を有し、このがん幹細胞を起点に腫瘍が再構築される (4,5) (Fig. 1)。膠芽腫組織中においても自己複製能と多分化能を有する膠芽腫幹細胞が存在することが報告されている (6-12)。この膠芽腫幹細胞は、化学療法 (13) と放射線療法 (14) に強い耐性を示し、膠芽腫の再発に寄与する (15)。したがって、膠芽腫幹細胞集団における新規治療標的を解明することが必要である。



**Figure 1. Evolutionary process of cancer stem cells.**

がん幹細胞は、幹細胞ニッチと呼ばれる特殊な環境に存在し、様々ながん種における治療抵抗性に関与することが報告されている (16)。低酸素状態にある幹細胞ニッチでは、低酸素応答シグナルの活性化ががん幹細胞の維持および治療抵抗性の獲得に重要な役割を担っていることが報告されている (17-19)。膠芽腫は腫瘍細胞による血管新生に関わるタンパク質である VEGF の産生が亢進することで血管新生が促進され急速に腫瘍

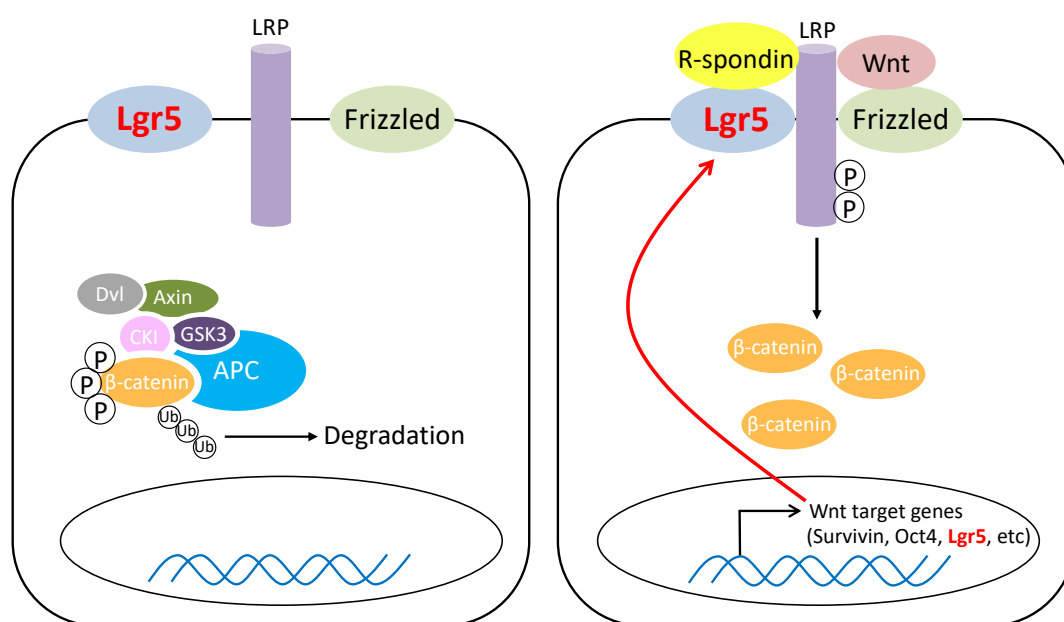
の増大をもたらす。そのため、抗 VEGF 抗体医薬品であるベバシズマブによるテモゾロミド治療への上乗せ効果に関する臨床試験がこれまでに実施されたが、ベバシズマブの効果は腫瘍血管の正常化による浮腫の軽減など症状緩和には有効であるものの、生命予後の改善には至っていない (20)。また膠芽腫組織内では、微小壊死組織周辺の酸性領域や一部の脈管構造の機能障害により低酸素状態になっている領域が存在する (Fig. 2)。腫瘍組織の酸性化と低酸素状態はしばしば同時に発生するが、これらの領域は独立して存在することが明らかになっている (21)。腫瘍組織の酸性化は、治療抵抗性や腫瘍細胞の浸潤などに寄与するが、特に、低酸素領域周辺では低酸素応答シグナルの活性化および低酸素誘導因子などの発現が促進されることで、膠芽腫幹細胞が維持されている。したがって、低酸素応答シグナルに関連する詳細な遺伝子発現メカニズムを解明することは、膠芽腫幹細胞の生物学を理解し効果的な治療戦略を開発する上で非常に重要である。



**Figure 2. Hypoxia and acidic stress exist in microenvironmental niches for glioblastoma stem cells.**

Lgr5 は Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の構成因子であり、Wnt シグナルを増強することによって幹細胞の維持に寄与している (22)。Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路における Lgr5 の分子機能として次のような知見が積み上がっている。Wnt による刺激のない状態では、細胞質の  $\beta$ -Catenin が Axin、APC、GSK3 $\beta$ 、CKI から成る Axin 複合体によるリン酸化と、それに伴ってユビキチン化を受けて、最終的にはプロテアソームにより分解され、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の活性は負に調節されている。Wnt リガンドが細胞膜において受容体 Frizzled に結

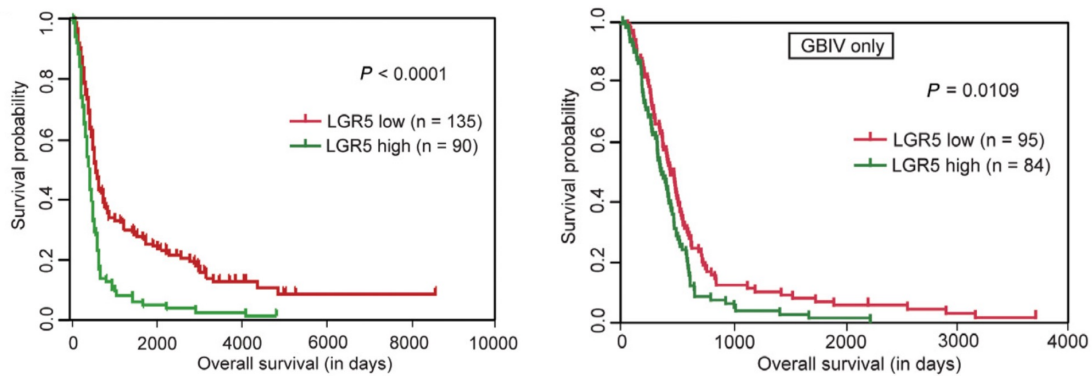
合すると、Dvl が細胞膜へ動員されることで Axin 複合体の機能が抑制され、 $\beta$ -Catenin は安定化し核へ移行した後、転写因子である Tcf/Lef と結合し下流標的遺伝子の発現を促進することにより細胞の増殖や分化を制御する。この、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の活性が正に調節されている状態では、さらに、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の可溶性タンパク質モジュレーターである R-spondin が、細胞膜において Lgr5 と複合体を形成し、さらに LRP または Frizzled 受容体とともに三次元複合体を形成することで LRP の自己リン酸化に続いて Wnt/ $\beta$ -Catenin シグナル伝達を増強する (Fig. 3)。また、Lgr5 自身が Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の下流標的遺伝子であることから、Lgr5 は Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の活性を幹細胞特異的に増幅する因子として機能すると考えられている (23)。



**Figure 3. Functional roles for Lgr5 in the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway.**

これまでに Lgr5 は、腸上皮、胃、皮膚、腎臓、および乳腺を含むさまざまな正常組織の幹細胞マーカーとして報告されている (24)。また、主に特異的抗体を用いた組織染色によって、Lgr5 は結腸直腸、胃、食道、および子宮頸癌のがん幹細胞マーカーとしても報告されている (23,24)。Lgr5 はヒト臨床検体由来の膠芽腫幹細胞で高発現し、膠芽腫幹細胞の生存に不可欠な要素であることが示されており (25)、膠芽腫組織における Lgr5 タンパク質発現レベルは、膠芽腫コホートにおける不良な予後と相関することが報告されている (Fig. 4)。

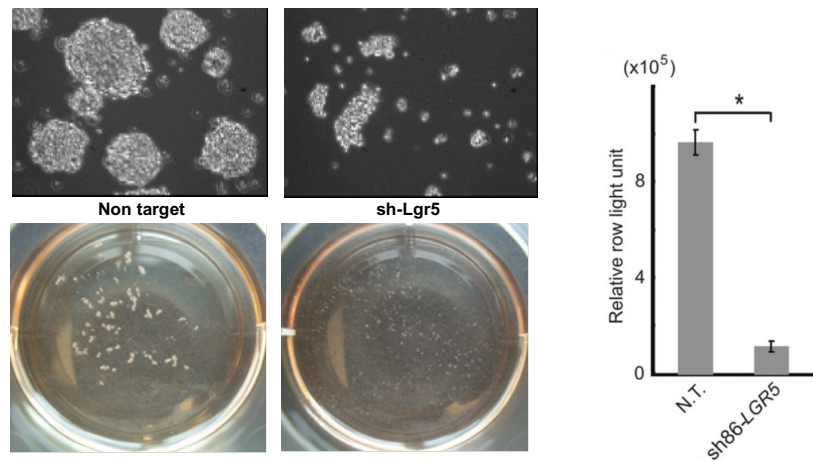




**Figure 4. Expression of LGR5 in gliomas.**

These figures were cited from Figure 5 in Nakata S et al. *Brain Pathol.* **2013**, 23, 60-72.

さらに、ヒト膠芽腫幹細胞において *Lgr5* をノックダウンすると細胞増殖が抑制されアポトーシスが誘導される (Fig. 5)。網羅的遺伝子発現解析により膠芽腫幹細胞における *Lgr5* ノックダウンは多数の低酸素応答遺伝子および *Wnt* 関連遺伝子とともに、*Stat5b* 遺伝子の発現を抑制することが示されている (Table 1) (25)。膠芽腫組織由来の *Lgr5* を高発現する細胞では *Wnt*/β-Catenin シグナルの活性化と膠芽腫幹細胞としての特性を発揮することが報告されている (26)。



**Figure 5. Lgr5 knockdown induced apoptosis in GSCs.**

These figures were cited from Figure 3 in Nakata S et al. *Brain Pathol.* **2013**, 23, 60-72.

膠芽腫幹細胞における *Lgr5* の発現調節機構については不明な点が多いが、過去の文献上、以下のメカニズムが報告されている。クロマチン免疫沈降法により様々な組織の発生、分化系列の決定において重要な役割を果たす転写因子である *Sox9* が膠芽腫細胞の *Lgr5* プロモーター領域に結合し *Lgr5* の発現を促進性に制御する (27)。さらに、*Sox9* を膠芽腫細胞においてノックダウンすると *Lgr5* の発現が抑制され、膠芽腫細胞の腫瘍

形成能を顕著に抑制することが示されている (27)。したがって、Sox9 を介した Lgr5 の転写調節が膠芽腫細胞の腫瘍形成に重要であることが予想される。

また、*Lgr5-GFP* ノックイン膠芽腫マウスから分離した膠芽腫幹細胞における網羅的遺伝子発現解析により、Hedgehog 経路関連遺伝子である Gli2 や Ptch2、また下流標的遺伝子 Cyclin B1 等が高発現していることが示されている (28)。この膠芽腫幹細胞において Gli2 をノックダウンすると細胞増殖が抑制され細胞周期の停止とアポトーシスを誘導するとともに、膠芽腫幹細胞の遊走・浸潤能が低下する。さらに、Gli2 ノックダウンにより Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の関連遺伝子である Dvl3 と Lgr5 の発現が低下することも示されている。Gli 阻害剤 GANT61 を膠芽腫幹細胞に作用させた検討においても、ノックダウンでの実験結果と合致して Lgr5 の発現抑制と細胞増殖抑制およびアポトーシスの誘導が生じることが明らかにされている。このように、膠芽腫幹細胞における Lgr5 の発現制御機構には Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路のみならず Hedgehog 経路が関与する可能性が示唆されている。

**Table 1.** List of genes downregulated upon LGR5 knockdown.

Gene symbol	Gene name	Fold change (Log2)	q-value (%)
CA9*	Carbonic anhydrase 9 precursor	-1.54	0
MT3	Metallothionein-3	-1.41	0
NDRG1	N-myc downstreamregulated gene 1 protein	-1.35	0
AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	-1.26	0
MIA	Melanoma-derived growth regulatory protein precursor	-1.25	0
ZNF395	Zinc finger protein 395	-1.08	0
WSB1	WD repeat and SOCS box-containing protein 1	-1.05	0
PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	-1.04	0
VEGFA*	Vascular endothelial growth factor A precursor	-1.03	0
SLC5A3	Sodium/myo-inositol cotransporter (Na+)	-1.01	0
RNASE4	Ribonuclease 4 precursor	-0.98	0
MT1A	Metallothionein-1A	-0.92	0
FZD3	Frizzled-3 precursor	-0.92	0
PRRT2	Proline-rich transmembrane protein 2	-0.90	0
C1orf54	Uncharacterized protein C1orf54 precursor.	-0.88	0
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	-0.88	0
PFKFB4*	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	-0.86	0
CCDC136	Coiled-coil domain-containing 136	-0.84	0
MFNG	Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase manic fringe	-0.83	0
ATP1A2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 precursor	-0.82	0
GSN	Gelsolin precursor	-0.82	0
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	-0.81	0
SLC6A6	Sodium- and chloride-dependent taurine transporter.	-0.79	0
RAB20	Ras-related protein Rab-20.	-0.79	0
<b>LGR5*</b>	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 precursor	-0.78	0
ATP2B4	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	-0.78	0
TNNT1	Troponin T	-0.77	0
FCGR2A	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a precursor	-0.76	0
PPFIA4	Liprin-alpha-4	-0.76	0
NAT10	N-acetyltransferase 10	-0.74	0
MYO9A	Myosin IXA	-0.72	0
L1CAM*	Neural cell adhesion molecule L1 precursor	-0.67	0
NEDD4L	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like protein	-0.65	0
<b>STAT5B</b>	Signal transducer and activator of transcription 5B.	-0.63	0
C12orf57	Putative C10 protein.	-0.63	0
SCD	Acyl-CoA desaturase	-0.61	0
GPR125	Probable G-protein coupled receptor 125 precursor.	-0.61	0
MGLL	Monoglyceride lipase	-0.61	0
FRAS1	Extracellular matrix protein FRAS1 precursor.	-0.60	0
RUNX1	Runt-related transcription factor 1	-0.60	0
CBR3	Carbonyl reductase	-0.60	0
TUB	Tubby protein homolog.	-0.59	0
PHF19	PHD finger protein 19 isoform a	-0.59	0
SLC44A1	Choline transporter-like protein 1	-0.58	0
LPIN1	Lipin-1.	-0.58	0
WDR54	WD repeat protein 54.	-0.57	0
COL9A1	Collagen alpha-1(IX) chain precursor.	-0.57	0
GBE1	1,4-alpha-glucan branching enzyme	-0.55	0
ADCK4	Uncharacterized aarF domain-containing protein kinase 4	-0.55	0
NAV1	Neuron navigator 1	-0.54	0
ADNP2	Zinc finger protein 508.	-0.54	0
MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3	-0.53	0
ARMCX4	Armadillo repeat-containing X-linked protein 4.	-0.53	0
CCDC113	Coiled-coil domain-containing protein 113	-0.51	0
PTCHD1	Patched domain-containing protein 1.	-0.51	0
AHCTF1P	AT-hook-containing transcription factor 1	-0.65	0.6024903
SLC22A17	Brain-type organic cation transporter	-0.63	0.6024903

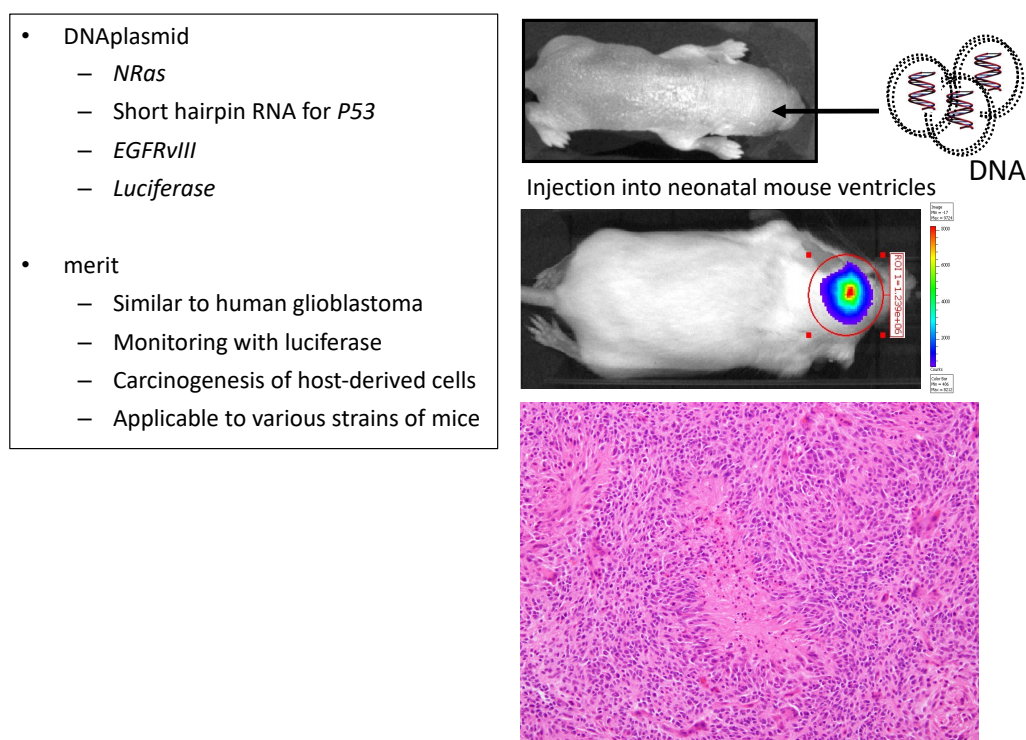
**Table 1.** List of genes downregulated upon LGR5 knockdown.

This table was cited from Table 1 in Nakata S et al. *Brain Pathol.* **2013**, 23, 60-72.

Stat5b は 7 種類存在する Stat ファミリーメンバーのひとつであり (29)、インターロイキン-6 や上皮成長因子 (EGF) などのサイトカインおよび成長ホルモンなどによる刺激により活性化される (30-32)。JAK/STAT シグナルは種々の固形がんおよび造血器腫瘍の病態形成に関与する。特に、Stat3/5 の活性化は、複数のがんの進行に関与している (33)。Stat3 は中枢神経系組織に由来する悪性腫瘍の進行に重要な役割を果たしていることが報告されており (34)、Stat5b は免疫細胞および造血細胞の生存、増殖、分化に関与しているものと推察される (35)。Stat5b は Stat5a と 94% の相同性を示し、造血器腫瘍において独自の分子機能を有する (36)。近年、Stat5b<sup>N642H</sup> を含むアグレッシブ T 細胞性白血病/リンパ腫において Stat5b の恒常的活性化を引き起こす変異が報告されている (37)。神経膠芽腫において、JAK/STAT シグナルの活性化が不良な予後に相関することが示されているが (38)、膠芽腫幹細胞の制御における Stat5b の機能的役割は不明である。

膠芽腫組織における heterogeneity が化学療法や放射線療法に対する治療抵抗性に関与することが報告されている (39)。The Cancer Genome Atlas (TCGA) データを用いた網羅的ゲノム解析によると、膠芽腫組織において細胞増殖や成長を制御するチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) である EGFR の遺伝子増幅が高頻度に生じている (40,41)。しかし、既存の EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の膠芽腫に対する治療効果は限定的であるため (42,43)、EGFR 下流のシグナル伝達について研究が進んでいる。膠芽腫における EGFR の変異のうち、リガンド結合ドメイン欠損型である EGFRvIII は最も高頻度に見られ、その恒常的活性化ががんの悪性度に大きく関与している。また、膠芽腫組織において、RTK/RAS/PI(3)K シグナル経路における EGFR 下流での RAS の変異が細胞増殖や生存などに関与する (40)。細胞内に局在する Stat はインターロイキン-6 受容体等の下流で JAK を介して活性化されるが、EGFR 下流で JAK 非依存的にも活性化され下流標的遺伝子の発現を制御する (44)。Fan らは、ヒト膠芽腫細胞株における EGFR/EGFRvIII の共発現がそれぞれ単独発現に比較して腫瘍形成能が有意に増大することをマウス皮下腫瘍モデルにより明らかにし、膠芽腫の腫瘍形成能における EGFR と EGFRvIII の協同作用を証明した (45)。ヒト膠芽腫細胞株である LN-229 において EGFR/EGFRvIII の共発現株でリン酸化 Stat3 およびリン酸化 Stat5 の発現が顕著に増加することが示されている (45)。したがって、膠芽腫細胞における EGFR/EGFRvIII の発現およびその下流における Stat タンパク質の活性化が腫瘍形成において重要な役割を担っている可能性が推察される。

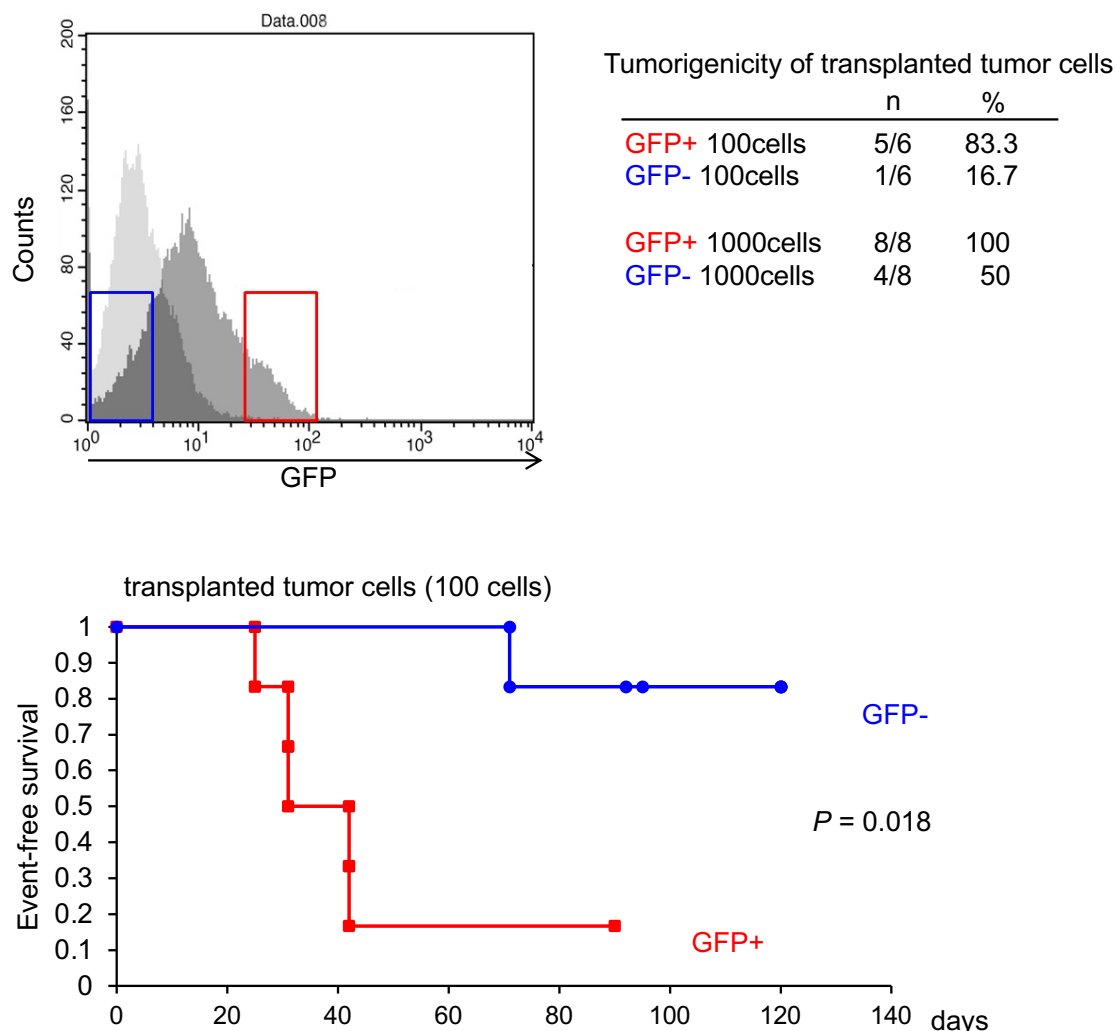
そこで、*in vivo* で *shTP53*、*EGFRvIII*、*NRasG12V* 遺伝子を *Sleeping-Beauty* トランスポゾンシステムにより導入する、新規マウス膠芽腫モデルが確立されている (46)。これらの発がん性遺伝子発現ベクターの混合物を新生仔マウスの側脳室に注入すると、脳室周囲帯に存在する神経幹細胞にこれらの発がん性遺伝子が導入される。このモデルマウスは偽柵状配列 (*pseudopalisading*) を伴う微小壊死および腫瘍血管の増生を含む、膠芽腫の組織的特性を有する脳腫瘍が 2~3 ヶ月以内に発生し、膠芽腫の生物学を研究するための多用途なプラットフォームとなる (Fig. 6) (47)。さらに、膠芽腫組織由来の膠芽腫細胞に対して神経幹細胞の培養手法であるニューロスフェア法 (48) を応用することにより、膠芽腫幹細胞を培養維持することが可能であり、また、この膠芽腫幹細胞はウシ胎児血清を用いた接着系培養により、膠芽腫細胞に分化誘導できることが報告されている (25)。



**Figure 6. Mouse glioblastoma model established by Sleeping Beauty transposon system.**

近年、*Lgr5-GFP* ノックインマウスにこの *Sleeping-Beauty* トランスポゾンシステムを用いた膠芽腫作製モデルを応用したマウスモデルの腫瘍組織から、*Lgr5-GFP* 陽性細胞を分離し、100~1000 細胞の移植で別個体マウスへの腫瘍形成能を有する *Lgr5* 発現膠芽腫幹細胞ニューロスフェアが確立された (28)。この *Lgr5-GFP* 陽性細胞群は高いスフェロイド形成能を示し、野生型マウス大脳への移植により、*Lgr5-GFP* 陰性細胞群と比較して高い腫瘍形成能と無イベント生存期間の有意な短縮を認めた (Fig. 7)。このように、

マウス膠芽腫発症モデルにおいて、機能的な膠芽腫幹細胞マーカーとしての Lgr5 の有用性が実証されている。



**Figure 7. Lgr5-GFP-positive glioblastoma stem cells exhibit higher tumorigenicity.**

These figures were cited from Fig. 1 in Tanigawa et al. *Cancer Gene Ther.* **2021**, 10, 1038/s41417-020-00282-5.

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 に着目した。すなわち、初代培養ヒト膠芽腫幹細胞における Lgr5 ノックダウンがアポトーシスを誘導し、Stat5b の発現抑制をもたらすことが示されていることから (25)、本研究では、Lgr5 による膠芽腫幹細胞の促進性制御に、Stat5b の機能の亢進が関与するのではないかとはいふ仮説を立てた。

## 第 1 章

### 低酸素応答シグナルおよび Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路による Stat5b の発現制御機構

#### 1-1. 緒言

がん幹細胞の維持において低酸素応答シグナル経路の重要な転写因子である Hif1 $\alpha$  および Hif2 $\alpha$  は Notch、Oct4、JAK/STAT などのシグナル伝達経路や C/EBP $\delta$  などの転写因子を介して幹細胞の表現型を調節する上で極めて重要な役割を果たすことが知られている (49)。さらに、Wnt 経路の活性化は休止状態のがん幹細胞から活性ながん幹細胞への変換を誘導し、 $\beta$ -Catenin を介して下流の Cyclin D1 および Myc の発現を増加させ細胞周期の進行を促進する (50)。Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の活性化は、がん幹細胞のアポトーシスの調節にも重要な役割を果たす。Dickkopf-related protein 2 は、乳癌のがん幹細胞において  $\beta$ -Catenin 活性を抑制し、細胞周期の G0/G1 停止とアポトーシスを誘導する (51)。また、膠芽腫幹細胞における Wnt 関連幹細胞マーカー遺伝子である Lgr5 のノックダウンは、多数の低酸素応答遺伝子、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路関連遺伝子および Stat5b の発現抑制をもたらすことが明らかになっている (25)。これらの知見を踏まえ、膠芽腫幹細胞において、低酸素応答シグナルおよび Wnt シグナル経路の活性が、Stat5b の発現を制御するという仮説を立て、これを検証することを本章の第一の目的とした。また、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の阻害が、膠芽腫幹細胞の増殖を抑制すると同時に Stat5b の発現に与える影響を解明することを、本章の第二の目的とした。

まず、膠芽腫の腫瘍形成において、低酸素環境への適応と幹細胞性の維持に重要な機能を担う Hif2 $\alpha$  および Wnt 関連幹細胞マーカーである Lgr5 と Stat5b 発現の関与について、膠芽腫の臨床検体および *Sleeping-Beauty* transposon system により作製したマウス膠芽腫モデルの腫瘍組織中におけるこれら遺伝子の発現解析を実施した。膠芽腫の再発や治療抵抗性に寄与する膠芽腫幹細胞は (13-15)、腫瘍組織内でも特に微小壊死組織周囲の特殊な低酸素ニッチで維持されることが報告されているが (21)、膠芽腫幹細胞の低酸素環境への適応における Lgr5 や Stat5b の関与については不明であった。そこで、*Sleeping-Beauty* transposon system により作製したマウス膠芽腫組織から、正常神経幹細胞の培養手法であるニューロスフェア法により分離した膠芽腫幹細胞を用いて、低酸素条件下による Lgr5 と Stat5b の発現に与える影響を解析した。さらに、マウスモデル由来膠芽腫幹細胞を用いて、低酸素応答シグナル経路下流での Stat5b 発現制御機構について、特に低酸素応答シグナルの重要な転写因子である Hif2 $\alpha$  による Stat5b の発現制御を解析した。膠芽腫幹細胞はスフェアを形成することによりスフェア表面と内部では低酸素状態が異なる。そこで、低酸素状態を一様にするとともに、幹細胞性のない膠芽腫細胞に対する低酸素刺激が Lgr5 および Stat5b の発現に与える影響について、マウスモ

デル由来膠芽腫幹細胞にウシ胎児血清を加え分化誘導した膠芽腫細胞を用いて解析した。

さらに、膠芽腫組織における発現レベルと患者の予後に相関が認められた Wnt 関連幹細胞マーカー遺伝子である *Lgr5* が (25)、膠芽腫幹細胞の生存や増殖を制御する機構を明らかにするため、マウスモデル由来膠芽腫幹細胞を用いて *Lgr5* 下流での Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路に関連する分子および *Stat5b* の発現制御を解析した。ヒト膠芽腫組織由来膠芽腫幹細胞における *Lgr5* ノックダウンが膠芽腫幹細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが報告されている(25)。そこで、本膠芽腫幹細胞において Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の阻害による増殖抑制およびアポトーシス誘導に *Stat5b* の発現抑制が関与するのか検証した。



## 1-2. 実験方法

### 1-2-1. マウス膠芽腫モデルの作製

C57BL/6 および BALB/c マウスは、Charles River Laboratories Japan Inc. (Kanagawa, Japan) から入手した。実験動物は、京都薬科大学バイオサイエンス研究センターで、施設内動物実験委員会承認のプロトコールに従って取り扱った。マウス膠芽腫モデルの作製には、*Sleeping-Beauty* transposon system を用いた。生後 2 日以内の新生仔マウスを低体温麻酔下で定位固定装置 (51730D、Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) に固定し、DNA とカチオン性ポリマーtransフェクション試薬の複合体 (DNA/PEI 複合体) を 2  $\mu$ L、30 ゲージの針と 10  $\mu$ L ハミルトンシリンジをセットした自動注入システム (Legato130、KD Scientific, Holliston, MA, USA) を用いて、1  $\mu$ L /分 の速度で右側大脳室に注入した。注入座標は、 $\lambda$  から 1.5 mm 前方、0.7 mm 右側、1.5 mm 腹側で行なった。PEI 試薬は In vivo-JetPEI (Polyplus Transfection, NY, USA) を使用した。DNA プラスミドは *pT2/C-Luc//PGK-SB13* (0.2  $\mu$ g)、*pT/CAGGS-NRASV12* (0.4  $\mu$ g)、*pT3.5/CMV-EGFRvIII* (0.4  $\mu$ g) および *pT2/shP53* (0.4  $\mu$ g) を使用した。

### 1-2-2. 抗体

後述の免疫組織化学染色、ウェスタンブロッティング法、およびフローサイトメーターによる細胞表面タンパク質の検出には以下の抗体をそれぞれ購入し用いた。

免疫組織化学染色の一次抗体には、以下の抗体を用いた。

Name of antibody	Source/Isotype	Dilution	Product code	Company
human Hif2 $\alpha$	Mouse IgG	1:500	MAB3472	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
mouse Hif2 $\alpha$	Mouse IgG	1:200	NB100-132	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
human Stat5b	Mouse IgG	1:50	sc-1656	Santa Cruz, CA, USA
human Lgr5	Rabbit IgG	1:50	LS-A1232	LSBio, WA, USA
mouse Lgr5	Rabbit IgG	1:200	bs-1117R	Bioss, Woburn, MA, USA
mouse Stat5b	Rabbit IgG	1:500	ab178941	Abcam, Cambridge, MA

二次抗体として、EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-mouse (K4000、DAKO、Carpinteria, CA, USA) および EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (K4003、DAKO) を用いた。

ウェスタンブロッティング法の一次抗体には、以下の抗体を用いた。

Name of antibody	Source/Isotype	Dilution	Product code	Company
$\beta$ -tubulin	Mouse IgG	1:1000	T4620	Sigma-Aldrich
GAPDH	Mouse IgG	1:1000	016-25523	Wako Pure Chemical Industries, Kyoto, Japan
Phospho-Stat5 (Tyr694)	Rabbit IgG	1:1000	ab32364	Abcam
Stat5b	Rabbit IgG	1:1000	ab178941	Abcam
Hif2 $\alpha$	Rabbit IgG	1:200	NB100-122	Novus Biologicals
Lgr5	Rabbit IgG	1:500	bs-1117R	Bioss
$\beta$ -Catenin	Rabbit IgG	1:1000	9587	Cell Signaling Technology (CST), Danvers, MA, USA
Oct4	Rabbit IgG	1:1000	ab19857	Abcam
Survivin	Rabbit IgG	1:1000	ab182132	Abcam

二次抗体として、Horse anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) (1:2000、PI-2000、Vector Laboratories, Burlingame, CA) および HRP-linked goat anti-rabbit IgG (1:2000、7074、CST) を用いた。

フローサイトメーターによる細胞表面タンパク質標識の一次抗体には、以下の抗体を用いた。

Name of antibody	Source/Isotype	Product code	Company
Lgr5	Rat IgG	MAB8240	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Isotype control	Rat IgG	MAB0061	R&D Systems

二次抗体として、Donkey Anti-Rat IgG H&L (1:2000、Alexa Fluor 555、ab150154、Abcam) を用いた。

### 1-2-3. 免疫組織化学染色

本研究は近畿大学医学部の倫理委員会によって承認されており、使用したヒト膠芽腫組織について、手術標本を提供した膠芽腫患者から書面によるインフォームドコンセントを得ている。ヒト膠芽腫組織およびマウス膠芽腫組織のパラフィン包埋連続切片 (4  $\mu$ m) をキシレンで脱パラフィンし、エタノールの濃度を段階的に下げて再水和を行った。クエン酸 Buffer (10 mM、pH 6.0) または TE Buffer (50 mM Tris、0.2 mM EDTA、pH 9.0) を使用して、スチームクッカーで 40 分間加熱しながら抗原賦活処理を行った。内因性ペルオキシダーゼは、3% 過酸化水素を含む TBST (0.05% Tween-20 含有) を 10

分間作用させることにより阻害した。BSA および正常ヤギ血清を含む TBST (1% BSA、20% Goat serum) で室温下、1 時間ブロッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を、4°C で一晩反応させた。TBST にて穏やかに振とうさせながら 5 分間、2 回洗浄した後、二次抗体を室温で 30 分間、反応させた。抗体希釈液には、Antibody Diluent with Background Reducing Components (S3022、DAKO) を使用した。ヒト膠芽腫組織切片におけるタンパク質の発現シグナルは、TBST で 15 分間、2 回洗浄した後に VECTASTAIN Elite ABC-HRP Kit (PK-6100、Vector Laboratories、Burlingame、CA) を室温で 1 時間反応させ、TBS で 30 分間、2 回洗浄した後に DAB 試薬 (0.05 M Tris-HCl、pH 7.6、DAB) を用いて発色させた。核はヘマトキシリン溶液に 30 秒間反応させた後に、流水下で 5 分間、色出しを行なった。染色後の切片は 90% エタノールおよび 99% エタノールによる脱水、キシレンによる透徹処理後、マリノールを用いて封入した。マウス膠芽腫組織切片におけるタンパク質の発現シグナルは TBST で 5 分間、2 回洗浄した後に Envision+ System and AEC (K3461、Dako) を用いて発色させた。核はヘマトキシリン溶液に 30 秒間反応させた後に、流水下で 5 分間色出しを行なった。染色後の切片は Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium (S1964、DAKO) を用いて封入した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色では、核をヘマトキシリン溶液に 4 分間反応させた後に、流水下で 5 分間、色出しを行ない、細胞質をエオジン溶液に 1 分間反応させた後にエタノールの濃度を段階的に上げて脱水後キシレンで透徹し、Mount-Quick (Daido Sangyo、Saitama、Japan) を用いて封入した。

#### 1-2-4. 細胞と培養条件

マウス膠芽腫幹細胞は正常神経幹細胞の培養手法である、ニューロスフェア法を用いて、マウス膠芽腫組織から分離および培養した。腫瘍組織をメスで細分化し、accutase (Innovative Cell Technologies、San Diego、CA、USA) で 37°C で 20~30 分間消化した後、洗浄し、Neurobasal Medium (Gibco/Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) に 0.1% penicillin/streptomycin (Gibco、それぞれ 10 units/mL、10 µg/mL) と L-Glutamine (2 mM、Wako) を加えたものに、さらに、B27 および N2 supplement (Gibco) と EGF (10 ng/mL) および bFGF (10 ng/mL) を加えた神経幹細胞用培地 (SCM) を用いて、ノンコーティングディッシュ中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。ニューロスフェアは accutase を加え、37°C、1400 rpm で振とう解離し、SCM 中にて培養維持した。膠芽腫幹細胞から分化誘導した膠芽腫細胞は、膠芽腫幹細胞を DMEM (Nacalai Tesque) に 10% ウシ胎児血清 (FBS、HyClone、GE Healthcare Life Sciences、Buckinghamshire、England) および 0.1% penicillin/streptomycin (Gibco、それぞれ 10 units/mL、10 µg/mL) を加えた培地を用いて、コーティングディッシュ中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し樹立した。膠芽腫幹細胞および分化誘導した膠芽腫細胞の低酸素条件下での培養には、CO<sub>2</sub> Incubator 9000EX (WakenBtech、Kyoto、Japan) を用いた。

#### 1-2-5. 定量的リアルタイム PCR (RT-qPCR) 法

正常酸素条件下 (21% O<sub>2</sub>) および実験結果に示す種々の低酸素条件下で培養した膠芽腫幹細胞および膠芽腫細胞を回収し、およそ  $1 \times 10^6$  個の細胞あたり 500  $\mu$ L の TRIzol (Thermo Fisher Scientific) に溶解し、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて以下のように全 RNA 抽出物を精製した。溶解物に 100  $\mu$ L のクロロホルム (Wako) を加え、激しく混和した。12,000 xg、4°C で 15 分間遠心分離し、回収した上清と同量の 100% エタノール (Wako) を加えて激しく混和した。得られた混合物の全量を RNeasy スピニングカラムに移し、12,000 xg、室温で 15 秒間遠心分離した。下層を廃棄し、Buffer RW1 を 700  $\mu$ L 添加した。12,000 xg、室温で 15 秒間遠心分離し、下層を廃棄し、Buffer RPE を 500  $\mu$ L 添加した。これを一度繰り返し、12,000 xg、室温で 2 分間遠心分離し、下層カラムを新たなカラムと交換し、最大速度、室温で 1 分間遠心分離した。下層カラムを新たな 1.5 mL チューブと交換し、上層カラムに RNase free の滅菌蒸留水 20  $\mu$ L を添加し、12,000 xg、室温で 1 分間遠心分離することにより下層に細胞全 RNA 溶液を得た。得られた全 RNA 500 ng から、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて以下のように逆転写反応を行い、cDNA を合成した。500 ng の RNA を滅菌蒸留水で 6  $\mu$ L とし、65°C で 5 分間加熱した。gDNA Remover を加えた 4x DN Master Mix 2  $\mu$ L を添加し、37°C で 5 分間加熱した。5x RT Master Mix II 2  $\mu$ L を添加し、37°C で 15 分、50°C で 5 分、98°C で 5 分間インキュベートした。得られた cDNA を THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) および Light Cycler 96 System (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) を用いて以下のような条件で RT-qPCR を行った。cycle 1: 95°C で 60 秒、cycle 2 (x 40): 95°C で 15 秒、60°C で 60 秒。遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子 *Tubulin-b1* の mRNA 発現量を内部標準として 2- $\Delta\Delta$ Cq 法を用いて算出した。Eurofins Genomics より購入し用いた各 Primer の配列は以下に示す。

Target		Sequence (5'→3')
<i>Stat5b</i>	Forward	CTCTGGTGGGGCAGAACGAG
	Reverse	TTGAGTCCCAGGCTTGGCTTT
<i>Lgr5</i>	Forward	GAGTCAACCCAAGCCTTAGTATCC
	Reverse	CATGGGACAAATGCAACTGAAG
<i>Tubulin-b1</i>	Forward	GCAGTGCGGCAACCAGAT
	Reverse	AGTGGGATCAATGCCATGCT

#### 1-2-6. ウェスタンブロッティング法

培養細胞を PBS で洗浄した後、遠心処理により細胞ペレットとした。回収した細胞を SDS Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl、1% SDS) にプロテアーゼ阻害剤 (Nacalai Tesque、

Kyoto, Japan) および PhosSTOP EASYpack (Roche Diagnostics) を加えたもので溶解し、氷冷させながら超音波処理にて細胞を破碎した。溶解液を 4°C、20,000 xg で 30 分間、遠心分離し、上清に含まれる可溶性のタンパク質抽出液を回収した。細胞抽出液は BCA タンパク質測定法を用いてタンパク質濃度を決定し、それぞれ 1 サンプルあたりタンパク質量として 10~30 µg に 5x sample buffer (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue) を加え、95°C、5 分間熱変性を行い、検出するタンパク質の分子量に応じた 7%、10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した。7%ゲルはウェット式 (50 V/gel 定電圧、60 分)、10%ゲルはセミドライ式 (170 mA/gel 定電流、90 分) にて PVDF メンブレンに転写した後、phospho-Stat5 を検出する際は Blocking one-P (Nacalai Tesque) で、Stat5b、Hif2 $\alpha$ 、Lgr5、 $\beta$ -Catenin、OCT4、および Survivin を検出する際は 5% スキムミルクを含有する TBST で、 $\beta$ -tubulin および GAPDH を検出する際は 3%スキムミルクを含有する TBST で室温下、1 時間ブロッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を、4°C 一晩、緩やかに振とう、もしくは、室温で 1.5 時間、パラフィルム上で静置し反応させた。ブロッキング溶液、もしくは TBST にて穏やかに振とうさせながら 5 分間、3 回洗浄した後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。抗体希釈液には phospho-Stat5 を検出する際は Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) を Stat5b、Hif2 $\alpha$ 、 $\beta$ -tubulin および GAPDH を検出する際は Signal Enhancer HIKARI (Nacalai Tesque) を  $\beta$ -Catenin、Oct4 および Survivin を検出する際は 5% スキムミルクを含有する TBST を使用した。タンパク質の発現シグナルは、メンブレンを TBST で 5 分間、3 回洗浄したのちに TBS で 2 回洗浄し、通常は Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用い、発現量が少なく検出が困難な場合は Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque) を用いて発色させ、ChemiDoc XRS Plus の CCD カメラで検出した。各レーンにおける発光強度は、Bio Rad image lab 6.1 software (Bio-Rad Laboratories) により測定し、それぞれ対応するローディングコントロールの発光強度で補正後、コントロールサンプルに対する相対値を算出した。

#### 1-2-7. shRNA 導入トランスフェクション条件

shRNA 発現レンチウイルスベクターの作製には、パッケージングベクターとして psPAX2、エンベロープベクターとして PMD2G を Addgene (Cambridge, MA, USA) から購入した。shRNA クローンは MISSION pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich) を購入し使用した。パッケージング細胞として、HEK293T 細胞を DMEM (10% FBS、0.1% penicillin/streptomycin) 中で 10 cm コーティングディッシュ中で 80% コンフルエントに培養したものをを用いた。4.5 µg/dish の psPAX2、PMD2G 発現 DNA プラスミドおよび 9 µg/dish の target shRNA 発現プラスミド DNA と PEI 試薬をトランスフェクション用無血清培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 中で混合し、室温、15 分間静置させ、

penicillin/streptomycin を含まない DMEM へ培地交換後 HEK293T 細胞に添加した。72 時間後に、培養上清液を回収し、4°C、100,000 xg で 90 分間、超遠心分離後、ウイルス粒子を PBS で懸濁し回収した。ウイルス粒子の力価は turbo-GFP 発現レンチウイルスベクターを形質導入した HEK-293T 細胞の GFP 陽性率をフローサイトメーター BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences、San Diego、CA、USA) で測定し算出した。Hif2 $\alpha$  ノックダウンは、膠芽腫幹細胞を  $1 \times 10^5$  個/well で 6 well plate に播種し、Hif2 $\alpha$  shRNA 発現レンチウイルスベクターを MOI 10 で添加後 4 日間培養して行った。Lgr5 ノックダウンは膠芽腫幹細胞を  $1 \times 10^5$  個/well で 6 well plate に播種し、Lgr5 shRNA 発現レンチウイルスベクターを MOI 10 で添加後 5 日間培養して行った。コントロールには Non target shRNA として、pLKO.1-puro 非標的 shRNA (Sigma-Aldrich、SHC016) を使用した。ウイルス粒子の力価測定には、pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP (Sigma-Aldrich、SHC003) を使用した。使用した target shRNA のクローン ID を以下の表に表す。

Target gene	TRC Clone ID
Hif2 $\alpha$	TRCN0000082306
Lgr5	TRCN0000028904

#### 1-2-8. フローサイトメーターによる細胞表面タンパク質の検出

膠芽腫幹細胞を 0.5% 酸素条件下で 2 日間培養後、accutase によりニューロスフェアを解離し回収した。分化誘導した膠芽腫細胞は 1% 酸素条件下で 3 日間培養後、PBS で洗浄した後に 37°C 約 2 分間のトリプシン処理にて細胞を剥離し回収した。回収した細胞を PBS で 3 回洗浄した後に、4% ホルムアルデヒドを含む PBS 中で室温 10 分間固定した。固定後の細胞を PBS で 3 回洗浄した後に、FACS Blocking Buffer (0.5% BSA、2% FBS、PBS) 中で氷上にて 30 分間ブロッキングを行なった。遠心分離により上清を除去し、抗 Lgr5 抗体またはアイソタイプコントロールを FACS Buffer (0.5% BSA、PBS) で希釈し  $2.5 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  個細胞の抗体量で、氷上にて 30 分間反応させた。FACS Buffer で 2 回洗浄後、二次抗体を上記の通り FACS Buffer で希釈し、氷上にて 30 分間遮光して反応させた。FACS Buffer で 3 回洗浄後、細胞を PBS で懸濁し、ナイロンメッシュを用いて凝集塊を除去したのち、フローサイトメーター BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) を用いて細胞表面 Lgr5 発現レベルを解析した。それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

#### 1-2-9. ICG-001 の溶解および添加条件

ICG-001 (#10-4378、Focus Biomolecules、Plymouth Meeting、PA、USA) は DMSO (Nacalai Tesque) で溶解した。膠芽腫幹細胞を  $1.0 \times 10^5$  個/well で 6 well plate に播種した後に、終濃度から 2 倍濃度となるよう培地で希釈した ICG-001 を培養液中に等量加え終濃度

とし、48 時間培養した。溶媒コントロールとして、細胞培養液中に 0.05% DMSO を加えた。

#### 1-2-10. 生細胞数の評価

膠芽腫幹細胞の生細胞数はトリパンプルー染色法によって評価した。ICG-001 を上記の添加条件にて 48 時間作用させ、ニューロスフェアを accutase で解離後、細胞懸濁液を調製した。等量の 0.4%トリパンプルー (Wako) を添加後、10  $\mu$ L を専用のスライドチャンバーにアプライし Countess II automated cell counter (Thermo Fisher Scientific) により計数した。トリパンプルーを排出し透明であった細胞を生細胞として、トリパンプルーによって染色された細胞を死細胞として計数し、スライド中 3 カ所の計測平均値を算出した。

#### 1-2-11. BrdU 細胞増殖解析

上記の条件にて ICG-001 を 48 時間作用させた膠芽腫幹細胞を APC BrdU flow kit (BD Biosciences) を用いて以下のプロトコールに従い、細胞周期における DNA 合成期 (S 期) の細胞割合について解析を行った。細胞培養液 2 mL 中に PBS で希釈した BrdU (1 mM) を 10  $\mu$ L 添加し、3 時間インキュベートした。accutase 処理にて細胞を解離後回収し、600 xg で 2 分間遠心分離して、上清を除去した。1 x BD Perm/Wash Buffer を 1 mL 加え、600 xg で 2 分間遠心分離して、上清を除去した。BD Cytofix/Cytoperm Buffer を 100  $\mu$ L 加え、15 分間氷上に静置した。1 x BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。BD Cytoperm Plus Buffer を 100  $\mu$ L 加え、10 分間氷上に静置した。1 x BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。BD Cytofix/Cytoperm Buffer を 100  $\mu$ L 加え、5 分間氷上に静置した。1 x BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。DNase (60  $\mu$ g/mL) を 100  $\mu$ L 加えて、15 分間 37°C 温浴でインキュベートした。1 x BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。1 x D Perm/Wash Buffer で 1:100 に希釈した APC-BrdU を 50  $\mu$ L 加え、暗所で 20 分間静置した。1 x BD Perm/Wash Buffer で洗浄した。7-AAD 20  $\mu$ L と Staining Buffer 1 mL を加えて懸濁した。ナイロンメッシュを用いて凝集塊を除去したのち、フローサイトメーターFACS BD LSRFortessa X-20 cell Analyzer を用いて解析した。それぞれのサンプルは、10,000 個以上の細胞を用いて解析を行った。

#### 1-2-12. アポトーシス解析

MEBCYTO Apoptosis Kit (MBL, Nagoya, Japan) を用い、アポトーシス細胞割合について解析を行った。上記の条件にて ICG-001 を 48 時間作用させた膠芽腫幹細胞を accutase 処理にて細胞を解離後回収し、200 xg で 2 分間遠心分離して、上清を除去した。PBS で 1 回洗浄後、添付文書のプロトコールに従って Annexin V および PI で細胞を染色した。各蛍光強度でプロットした図を用いて、それぞれの陽性細胞を陰性コントロー

ルを用いて定義し、4 分割に分析した。Annexin V-陽性かつ PI-陰性細胞を初期アポトーシス細胞として検出した。検出には、BD LSRFortessa X-20 cell Analyzer を用い、それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

#### 1-2-13. 統計学的処理

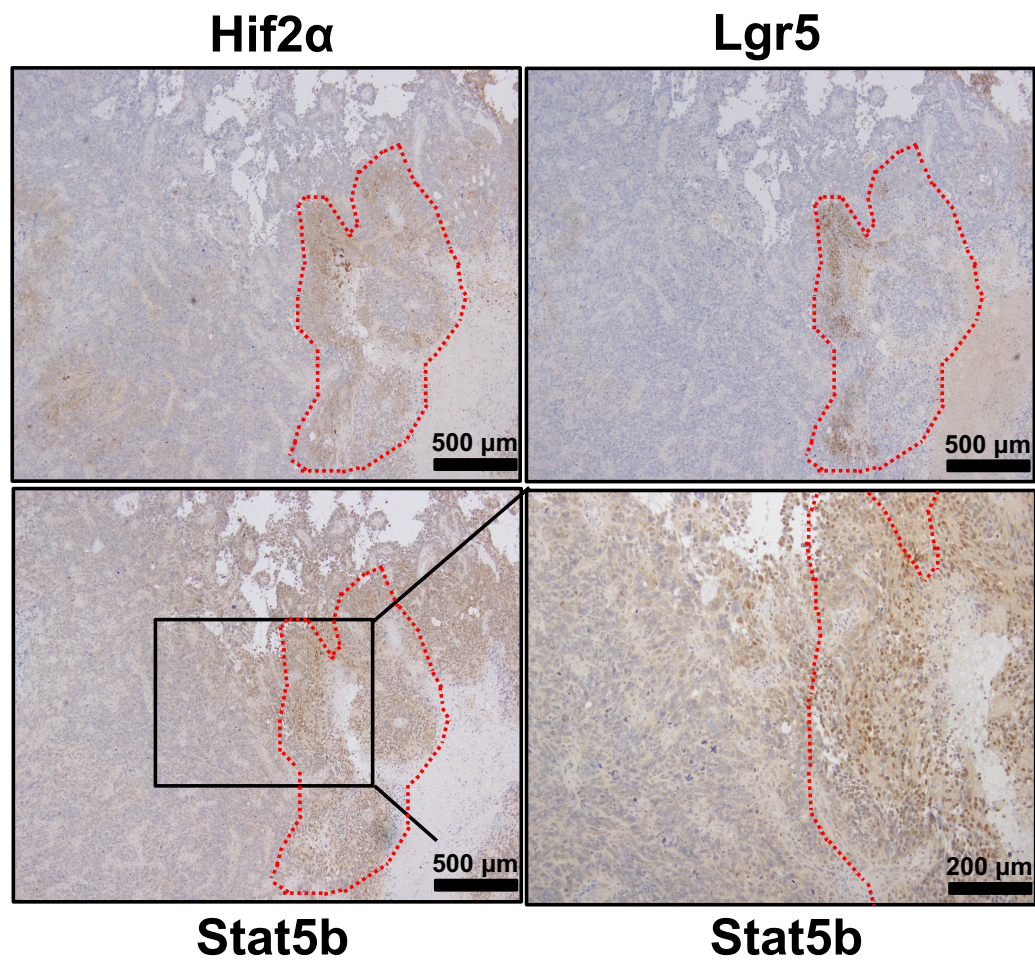
全てのデータはそれぞれ独立した 3 回以上の実験を行うことにより解析した。データは平均値  $\pm$  標準偏差 (S.D.) にて表示した。p 値はエクセル統計 (Social Survey Research Information Co., Ltd. Tokyo, Japan) を用いた Student's t-test 両側検定または Dunnett の多重比較検定を行うことにより算出し、得られた p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。



### 1-3. 実験成績

#### 1-3-1. ヒト膠芽腫組織における Hif2 $\alpha$ /Lgr5/Stat5b の発現解析

これまでにマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析にて、膠芽腫幹細胞における幹細胞マーカー遺伝子 Lgr5 のノックダウンにより発現が抑制される遺伝子として、Stat5b が同定されている (25)。そこで、膠芽腫組織における Lgr5 および Stat5b の発現様式を明らかにするために、ヒト膠芽腫の手術摘出病理検体を用いた免疫組織化学染色による解析を実施した。その結果、ヒト膠芽腫組織の連続切片において、赤色点線で囲まれた Hif2 $\alpha$  で標識される、微小壊死周囲の偽柵状配列 (pseudopalisading) を伴う低酸素領域に、Stat5b および Lgr5 を発現する細胞集団が観察されることを明らかにした (Fig. 8)。これまでの報告から、Hif2 $\alpha$  をはじめとする低酸素関連遺伝子の発現は、低酸素環境への適応における重要な要因であり、膠芽腫幹細胞の制御において重要な役割を果たすと考えられている (52)。これらの Hif2 $\alpha$  を発現する膠芽腫幹細胞集団が、やはり膠芽腫幹細胞マーカーである Lgr5 を発現し、さらに Stat5b を高発現している可能性を示唆している。また、Stat5b と Lgr5 の発現は、共に低酸素応答シグナルによって制御される幹細胞の維持に関連する可能性を示唆するものと考えられた。

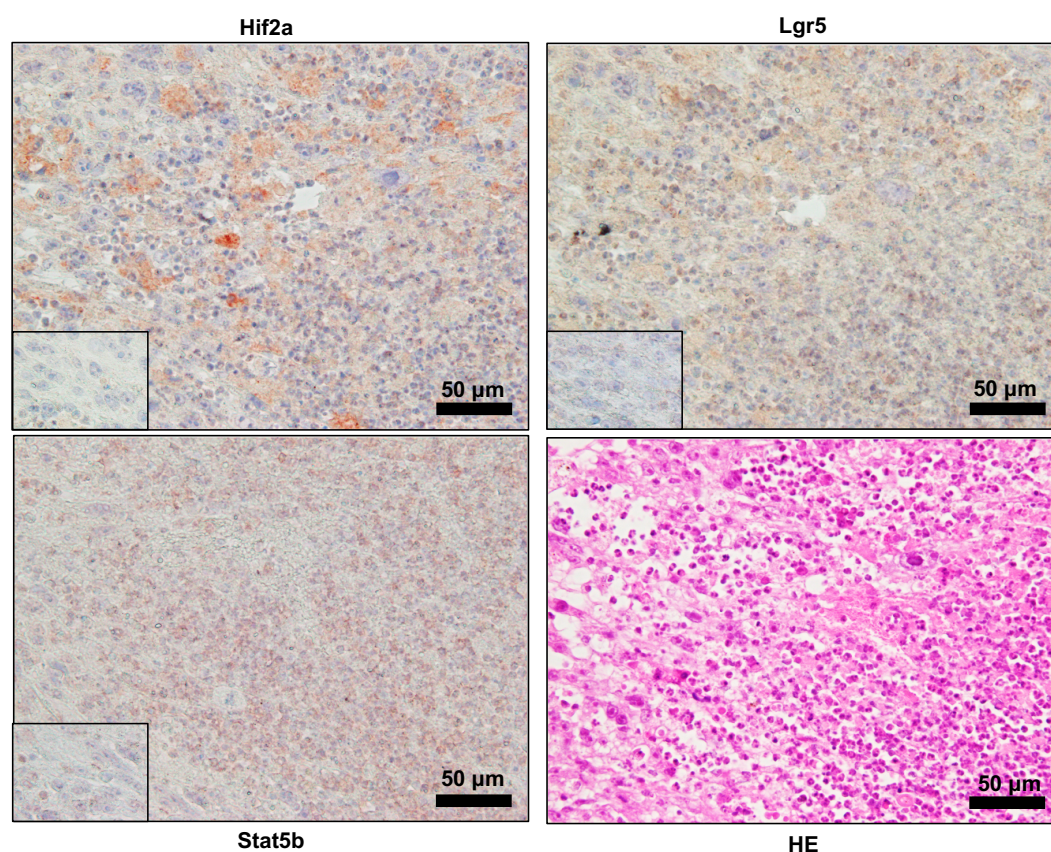


**Figure 8. Stat5b co-localizes with Lgr5 in Hif2 $\alpha$ -positive hypoxic regions in human GBM tissue.**

Representative images of immunohistochemical staining for Hif2 $\alpha$ , Lgr5, and Stat5b in human GBM tissue. This figure was cited from Figure 1 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 1-3-2. マウス膠芽腫組織における Hif2 $\alpha$ /Lgr5/Stat5b の発現解析

前項では、ヒト膠芽腫の手術摘出病理検体の連続切片において Hif2 $\alpha$  で標識される低酸素領域に Lgr5 と Stat5b の発現を確認した。そこで、*Sleeping-Beauty* transposon system により NRASV12 および EGFRvIII 遺伝子と shP53 を導入することで発がんさせたマウス膠芽腫モデル由来の膠芽腫組織においても、連続切片を用いて免疫組織化学染色による発現解析を行った。その結果、シグナル陰性の領域と比較してヒト膠芽腫組織でみられた Hif2 $\alpha$  陽性の低酸素領域における Lgr5 と Stat5b の発現シグナルが、マウス膠芽腫モデル由来の膠芽腫組織においても確認された (Fig. 9)。したがって、低酸素応答シグナルおよび Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の関連遺伝子である Hif2 $\alpha$  と Lgr5 の発現と Stat5b の発現が相互に関連している可能性が示唆された。

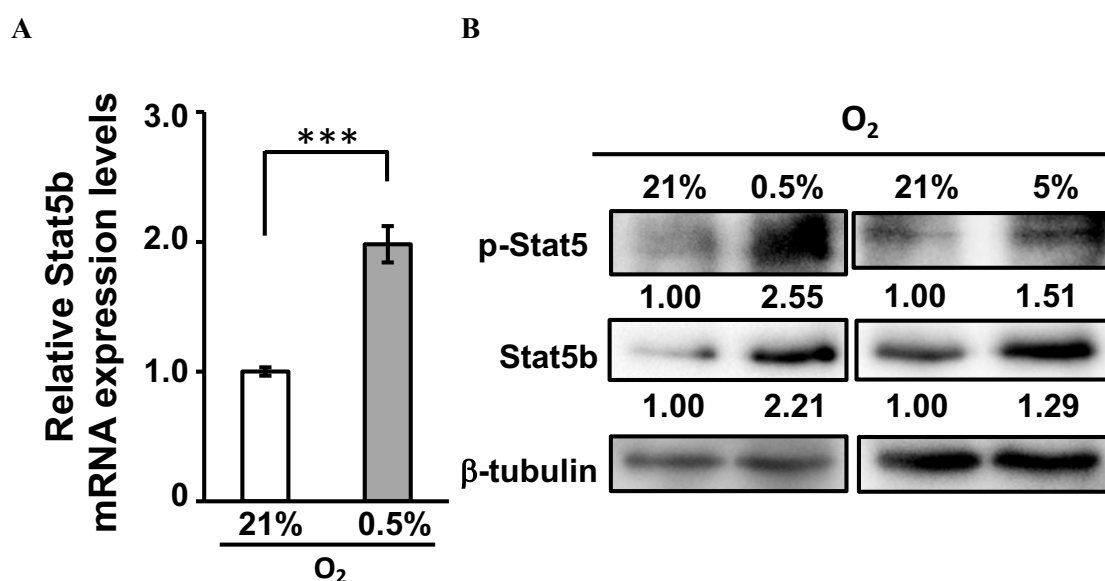


**Figure 9. Stat5b co-localizes with Lgr5 in Hif2 $\alpha$ -positive hypoxic regions in murine GBM tissue.**

Representative images of immunohistochemical staining for Hif2 $\alpha$ , Lgr5, and Stat5b in murine GBM tissue, and corresponding hematoxylin and eosin staining, are shown. Signal-negative regions are shown in the lower left. Scale bar, 50  $\mu$ m. This figure was cited from Supplementary Figure 1 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 1-3-3. 膠芽腫幹細胞において低酸素環境における培養条件が Stat5b 発現に与える影響の解析

膠芽腫幹細胞において Stat5b が低酸素応答シグナルにより発現制御を受けるのか検証するために、マウス膠芽腫モデル由来膠芽腫幹細胞を 0.5% あるいは 5% 酸素濃度による低酸素条件下で培養し、Stat5b mRNA およびタンパク質発現量を解析した。その結果、21% 酸素条件下と比べて 0.5% 酸素条件下において Stat5b mRNA 発現レベルが約 2 倍に上昇することを RT-qPCR 法により明らかにした (Fig. 10A)。タンパク質レベルでは、21% 酸素条件下と比べて 0.5% 酸素条件下においてリン酸化 Stat5 発現レベルが約 2.6 倍、Stat5b 発現レベルが約 2.2 倍に上昇した。さらに 5% 酸素条件下ではリン酸化 Stat5 発現レベルが約 1.5 倍、Stat5b 発現レベルが約 1.3 倍に上昇することを明らかにした (Fig. 10B)。このことから、膠芽腫幹細胞において Stat5b は低酸素刺激により発現誘導されるとともに、リン酸化を受け活性化されることが示唆された。



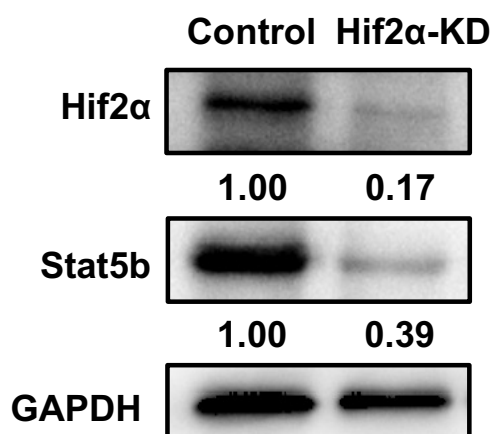
**Figure 10. Lgr5 and Stat5b expression are induced by hypoxia in GSCs.**

**A**, Stat5b mRNA levels were analyzed by RT-qPCR in GSCs cultured in hypoxic conditions for 2 days (0.5% O<sub>2</sub>; n=3; \*\*\*P<0.001). **B**, Western blot analysis of phospho-Stat5 and Stat5b in GSCs cultured in hypoxic conditions (0.5% O<sub>2</sub> for 4 days, 5% O<sub>2</sub> for 3 days). β-tubulin is shown as a loading control. Relative band intensity is shown. These figures were cited from Figure 1 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.



#### 1-3-4. 膠芽腫幹細胞における Hif2 $\alpha$ ノックダウンが Stat5b 発現に与える影響の解析

膠芽腫幹細胞において低酸素応答シグナル経路の重要な転写因子である Hif2 $\alpha$  が、Stat5b の発現に影響を与えるのか検証するために、レンチウイルスベクターを用いた Hif2 $\alpha$  に対する shRNA の形質導入により、Hif2 $\alpha$  のノックダウンを実施した。ウェスタンブロッティングにより、膠芽腫幹細胞においてコントロールと比較して Hif2 $\alpha$  の発現量が約 0.2 倍まで効率よくノックダウンされている条件において、Stat5b の発現量が約 0.4 倍まで抑制されることを明らかにした (Fig. 11)。したがって、膠芽腫幹細胞において Stat5b は低酸素刺激による、Hif2 $\alpha$  を介した発現制御を受ける可能性が示唆された。



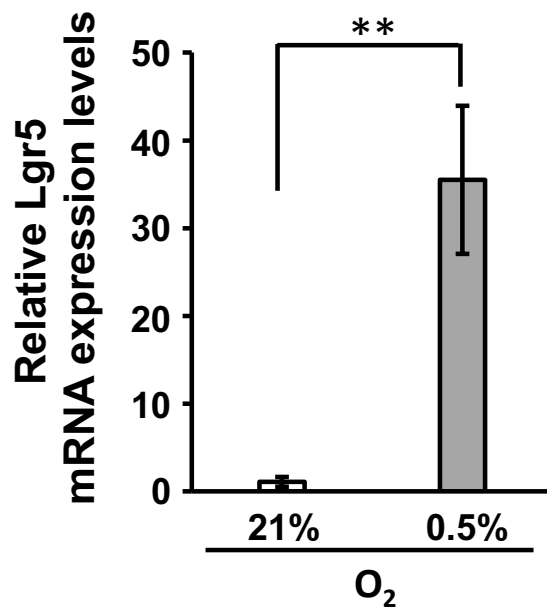
**Figure 11. Stat5b expression is suppressed by Hif2 $\alpha$  knockdown in GSCs.**

Western blot analysis of Hif2 $\alpha$  and Stat5b in GSCs after treatment with control-shRNA (Control) or Hif2 $\alpha$ -shRNA (Hif2 $\alpha$ -KD) for 4 days. GAPDH is shown as a loading control. Relative band intensity is shown. This figure was cited from Figure 1 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

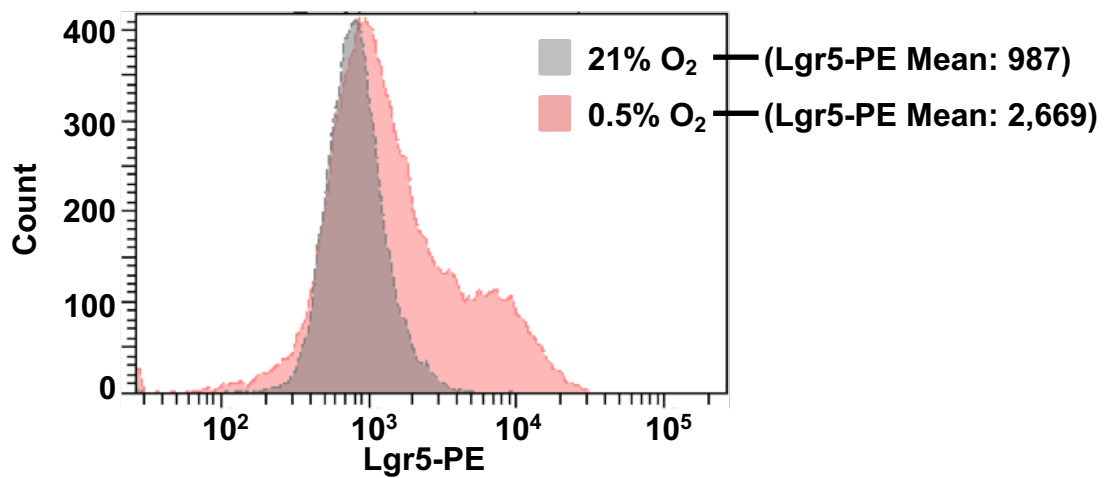
### 1-3-5. 低酸素環境による培養条件が膠芽腫幹細胞における Lgr5 発現に与える影響の解析

ヒトおよびマウス膠芽腫組織において、Hif2 $\alpha$  で標識される低酸素領域に Lgr5 の発現が確認されたことから、膠芽腫幹細胞において Lgr5 の発現が低酸素刺激により発現制御を受けるのかどうか解析を行った。その結果、膠芽腫幹細胞における Lgr5 mRNA 発現レベルは 21% 酸素条件下と比べて 0.5% 酸素条件下において約 35 倍に増加することを RT-qPCR 法により確認した (Fig. 12A)。次に、膠芽腫幹細胞への低酸素刺激による Lgr5 タンパク質発現量の解析を試みたが、ウェスタンブロッティング法のようなバルク解析では、細胞表面タンパク質である Lgr5 の発現変化を検証することが困難であった。そこで、細胞表面の Lgr5 タンパク質発現レベルを特異的抗体とフローサイトメーターを用いて低酸素刺激が Lgr5 発現量に与える影響を定量解析した。その結果、21% 酸素条件下と比べて 0.5% 酸素刺激により細胞表面の Lgr5 タンパク質発現レベルが約 2.7 倍に上昇することを明らかにした (Fig. 12B)。以上の結果から、膠芽腫幹細胞において幹細胞マーカー Lgr5 の発現は、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで、低酸素応答シグナルにより発現が誘導されることが示唆された。

A



B



**Figure 12. Lgr5 expression is induced by hypoxia in GSCs.**

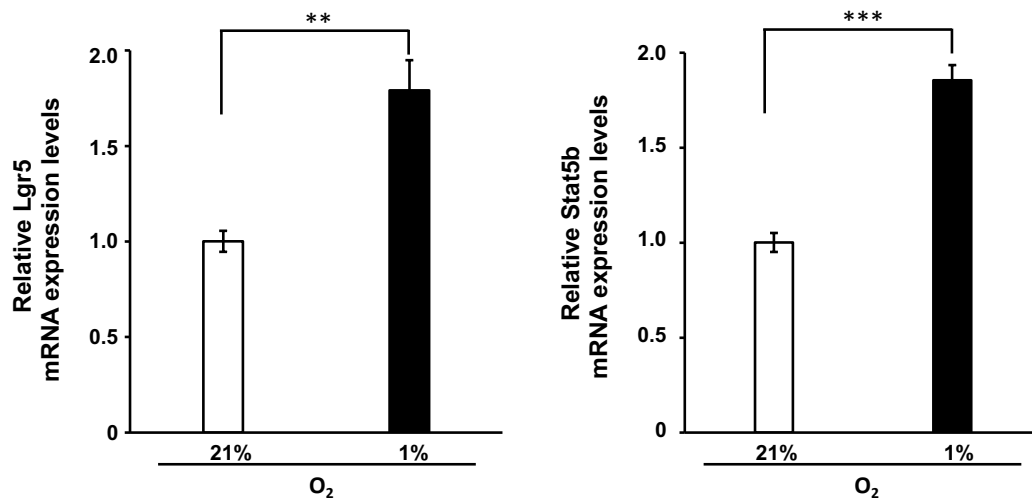
**A**, Lgr5 mRNA expression levels were analyzed by RT-qPCR in GSCs after 2 days in hypoxic conditions (0.5% O<sub>2</sub>; n=3; \*\*P<0.01). **B**, Lgr5 expression levels were analyzed by a flow cytometry in the GSCs after 2 days in hypoxic conditions (0.5% O<sub>2</sub>). These figures were cited from Figure 1 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 1-3-6. 分化誘導した膠芽腫細胞における低酸素刺激が Lgr5 および Stat5b の発現に与える影響の解析

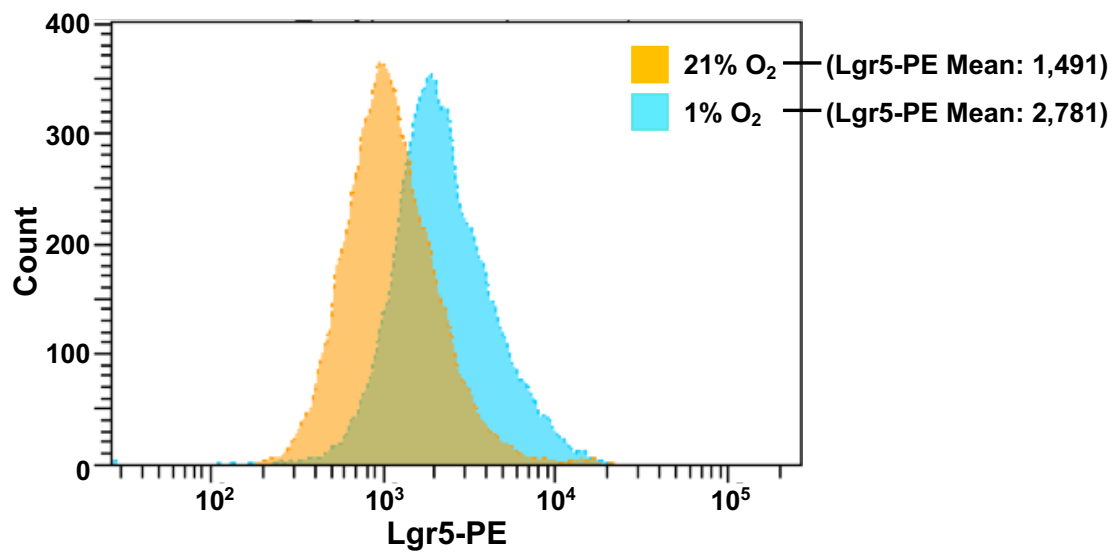
マウスモデル由来膠芽腫幹細胞に対する低酸素刺激により Stat5b および Lgr5 の発現誘導を確認したことから、幹細胞性のない膠芽腫細胞でも同様の結果が得られるか検証するために、ウシ胎児血清により膠芽腫幹細胞から分化誘導した膠芽腫細胞を作製した。本膠芽腫幹細胞はウシ胎児血清を用いた接着系培養により幹細胞マーカーCD133 および Lgr5 の発現低下とアストロサイトへの分化を示す GFAP の発現増加を伴って、膠芽腫細胞に分化誘導できることが過去の検討において検証されている (25)。したがって、本検討では接着系培養条件下で安定して培養維持された細胞集団を分化した膠芽腫細胞と定義し解析に用いた。まず、膠芽腫細胞の低酸素条件下での培養による Stat5b と Lgr5 mRNA の発現解析を行った。その結果、膠芽腫幹細胞と同様に、膠芽腫細胞において 21% 酸素条件下と比べて 1% 酸素条件下において Stat5b および Lgr5 の mRNA 発現が共に約 2 倍に上昇することを RT-qPCR 法によってみいだした (Fig. 13A)。さらに、フローサイトメーターによる細胞表面 Lgr5 タンパク質発現量解析により、21% 酸素条件下と比べて 1% 酸素条件下において細胞表面 Lgr5 タンパク質発現量が約 2 倍に上昇することを確認した (Fig. 13B)。以上の結果から、膠芽腫幹細胞だけでなく、分化誘導した膠芽腫細胞においても Stat5b および Lgr5 は共に低酸素応答シグナルにより発現が促進されることが示唆された。



**A**



**B**

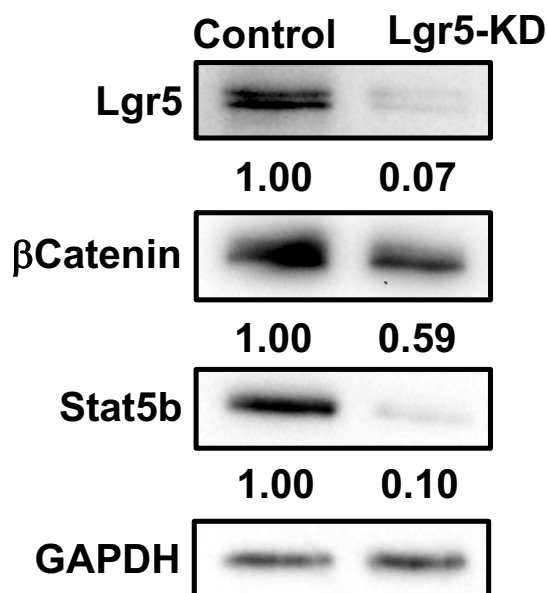


**Figure 13. Expression of Lgr5 and Stat5b is induced by hypoxia in adherent GBM cells.**

**A**, Lgr5 and Stat5b mRNA expression was analyzed by RT-qPCR in adherent GBM cells after 3 days of hypoxic stimulation (1% O<sub>2</sub>) (n=3; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). **B**, Lgr5 expression levels were analyzed by flow cytometry in adherent GBM cells after 3 days of hypoxic stimulation (1% O<sub>2</sub>). These figures were cited from Supplementary Figure 2 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 1-3-7. 膠芽腫幹細胞における Lgr5 ノックダウンによる Stat5b 発現への影響の解析

過去の研究により、初代培養のヒト膠芽腫幹細胞における Lgr5 ノックダウンにより Stat5b の発現が抑制されることが示されている (25)。そこで、本研究で用いたマウス膠芽腫モデル由来膠芽腫幹細胞でも同様に Lgr5 ノックダウンにより Stat5b の発現が抑制されるのかどうか検証を行った。その結果、Lgr5 の発現がコントロールと比べて 0.1 倍未満まで効率よくノックダウンされた条件において、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の重要な転写調節因子である  $\beta$ -Catenin の発現が約 0.6 倍に低下し、それに伴い Stat5b タンパク質発現レベルが約 0.1 倍まで抑制されることを明らかにした (Fig. 14)。これらの結果から、マウスモデル由来膠芽腫幹細胞において、Lgr5 は Wnt/ $\beta$ -Catenin シグナル伝達を促進性に調節し、また、Stat5b の発現も促進性に制御することが示唆された。



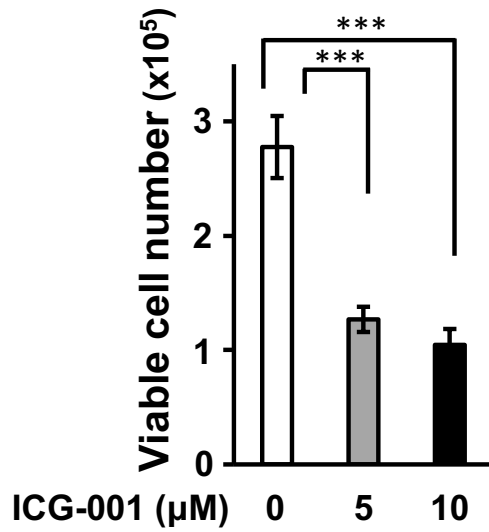
**Figure 14. Stat5b expression in GSCs suppressed by Lgr5 knockdown.**

GSCs were treated with control-shRNA (Control) or Lgr5-shRNA (Lgr5-KD) for 5 days, and then Lgr5,  $\beta$ -Catenin, and Stat5b were analyzed by western blot. GAPDH is shown as a loading control. Relative band intensity is shown. This figure was cited from Figure 2 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

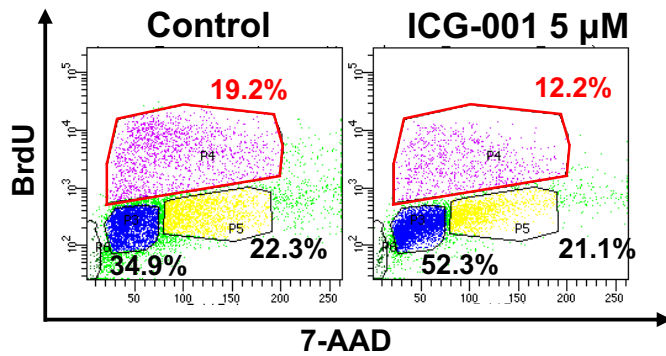
#### 1-3-8. Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路阻害剤 ICG-001 による膠芽腫幹細胞の増殖への影響の解析

Lgr5 ノックダウンにより、Stat5b の発現が抑制されたことから、膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現は Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路によっても制御を受けるといふ仮説を立てた。この仮説を検証するために、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の阻害剤である ICG-001 が膠芽腫幹細胞の増殖に及ぼす影響について解析した。ICG-001 は大腸癌細胞に対する抗腫瘍効果と正常大腸細胞への安全性が報告されている化合物である (53)。ICG-001 を 5  $\mu$ M および 10  $\mu$ M の濃度で 48 時間作用させた後に生細胞数を計測した結果、コントロールと比較して 5  $\mu$ M では約 0.4 倍、10  $\mu$ M では約 0.3 倍に膠芽腫幹細胞の増殖を有意に抑制した (Fig. 15A)。さらに、ICG-001 を 5  $\mu$ M の濃度で 48 時間作用させた後に BrdU 取り込みによる細胞周期解析を実施した結果、赤枠 P4 ゲート内の BrdU 陽性 DNA 合成期細胞の割合が、コントロールと比較して約 0.6 倍に減少した (Fig. 15B and C)。これらの結果から、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路が本膠芽腫幹細胞の DNA 合成および細胞増殖において重要な役割を果たしていることが示唆された。

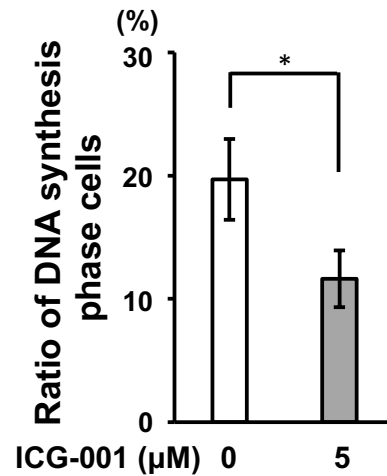
A



B



C

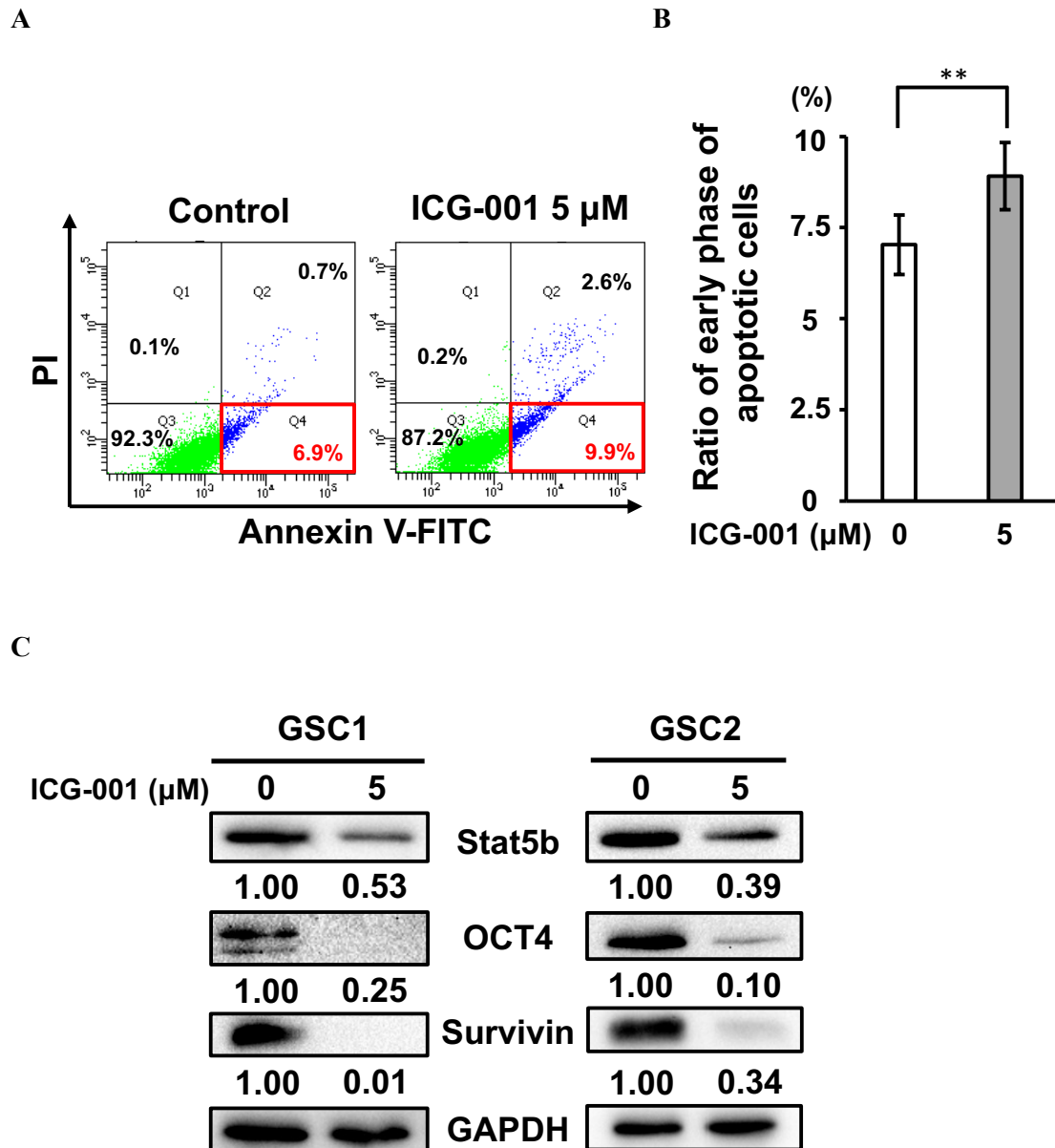


**Figure 15. Stat5b expression in GSCs regulated by Wnt pathway.**

**A**, GSCs were treated with ICG-001 for 48 h, and the number of viable cells was assessed using a trypan blue dye exclusion test (n=4; \*\*\*P<0.001). **B and C**, The percentage of BrdU-incorporated cells (P4) treated with DMSO (Control) or ICG-001 (5 μM) for 48 h was determined by flow cytometry (n=3; \*P<0.05). These figures were cited from Figure 2 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 1-3-9. Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路阻害剤 ICG-001 による膠芽腫幹細胞のアポトーシス誘導効果と Stat5b 発現に与える影響の解析

Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の阻害剤である ICG-001 による細胞増殖抑制メカニズムに、アポトーシスの誘導が関与するのか検証した。まず、マウスモデル由来膠芽腫幹細胞に ICG-001 を 5  $\mu$ M の濃度で 48 時間作用させた後に Annexin V/PI 染色によるアポトーシス解析を行った。その結果、赤枠 Q4 ゲート内の Annexin V 陽性/PI 陰性の早期アポトーシスの割合がコントロールと比較して約 25% 軽度増加することを明らかにした (Fig. 16A and B)。さらに、膠芽腫幹細胞において ICG-001 の作用により幹細胞性の維持およびアポトーシス誘導に関与する分子と Stat5b タンパク質発現への影響を解析した。別個体マウス由来膠芽腫幹細胞 (GSC1、GSC2) に対してそれぞれ ICG-001 を 5  $\mu$ M の濃度で 48 時間作用させウェスタンブロッティングを実施した。その結果、GSC1 ではコントロールと比較して Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の代表的な下流標的遺伝子のうち、幹細胞マーカーである Oct4 の発現レベルが約 0.3 倍、抗アポトーシス因子である Survivin の発現レベルが約 0.01 倍、Stat5b の発現レベルが約 0.5 倍に低下することを明らかにした (Fig. 16C; GSC1)。同様に GSC2 では Oct4 の発現レベルが約 0.1 倍、Survivin の発現レベルが約 0.3 倍、Stat5b の発現レベルが約 0.4 倍に低下することを明らかにした (Fig. 16C; GSC2)。以上の結果から、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の阻害は、膠芽腫幹細胞にアポトーシスを誘導し、また、膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現を抑制することが示唆された。



**Figure 16. Stat5b expression in GSCs regulated by Wnt pathway.**

**A and B**, Flow cytometric analysis of Annexin V/PI staining for the detection of apoptosis in GSCs treated with DMSO (Control) or ICG-001 (5 μM) for 48 h (n=6; \*\*P<0.001). **C**, Western blot analyses of Stat5b, OCT4, and Survivin in independent GSC lines treated with ICG-001 for 48 h. GAPDH is shown as a loading control. Relative band intensity is shown. These figures were cited from Figure 2 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

#### 1-4. 考察

本章では、膠芽腫組織における Stat5b および Lgr5 の発現様式について解析を行い、低酸素領域において両遺伝子が発現する領域が一致することを明らかにした。さらに、低酸素応答シグナルにおける重要な制御因子である Hif2 $\alpha$  および Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路関連幹細胞マーカー Lgr5 のノックダウン、および Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の阻害により膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現が抑制されることを示した。

近年、Lgr5 が膠芽腫の生物学において重要な役割を担っていることを示す知見が増加している (23)。各グレードのグリオーマにおける Lgr5 の発現レベルを比較した場合、高グレードのヒト神経膠腫組織、特に膠芽腫組織において Lgr5 が高発現していることが報告されている (25,26)。U87MG などの膠芽腫細胞株に対する Lgr5 のノックダウンは、*in vivo* において腫瘍形成能を抑制する (26,54,55)。Lgr5 は低悪性度神経膠腫の幹細胞画分で発現しており (56)、臨床検体由来の初代膠芽腫幹細胞における Lgr5 ノックダウンは、これら細胞の腫瘍形成能を抑制する (27,57)。近年、Lgr5-GFP ノックイン膠芽腫マウスを使用した解析により、Lgr5 陽性膠芽腫幹細胞がヘッジホッグシグナル伝達経路のエフェクター転写因子である Gli2 を発現し、Lgr5 発現とマウス膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能を調節することが示された (28)。しかし、Lgr5 下流における膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能に不可欠な責任分子は不明であった。

本研究では、Stat5b がヒトおよびマウス膠芽腫組織の Hif2 $\alpha$  陽性低酸素領域において Lgr5 と同じ領域に高発現することを明らかにした。過去の報告では、Hif2 $\alpha$  が膠芽腫幹細胞の調節に重要な役割を果たしており、微小壊死の周辺領域や血管周囲領域などの膠芽腫幹細胞ニッチで発現していることが示されている (17-22)。本研究では *in vitro* での解析により Stat5b の発現は、低酸素状態によって誘導され、膠芽腫幹細胞に対する Hif2 $\alpha$  ノックダウンにより減少すること明らかにした。実際に過去の報告では、低酸素状態が血管内皮細胞 (58) および海馬ニューロン (59) の Stat5 発現を刺激し、細胞の生存を促進することが示されている。これらの報告は、膠芽腫幹細胞の低酸素環境への適応に、Stat5b の発現誘導が関与している仮説を支持すると考えられる。

さらに、Lgr5 が mRNA レベルとタンパク質レベルの両方で膠芽腫幹細胞の低酸素刺激により促進されることを、本研究により初めて明らかにした。一方で、大腸がん細胞において低酸素が miR-215 を介して Lgr5 の発現を抑制することが報告されており (60)、本研究結果との乖離の理由については不明であるが、Lgr5 の発現を調節する組織特異的なメカニズムが存在する可能性が考えられる。膠芽腫幹細胞のスフェア形成は、内部に低酸素環境を形成することで *in vitro* における膠芽腫幹細胞の維持に寄与することが報告されている (61)。そこで本研究では、低酸素状態を一様にすると共に、幹細胞性のない膠芽腫細胞においても膠芽腫幹細胞と同様の細胞増殖や生存に関わるメカニズムや治療戦略が応用できるのか検討するために、膠芽腫幹細胞を分化誘導した膠芽腫細胞

に対する低酸素刺激による Stat5b および Lgr5 の発現レベルを解析した。その結果、膠芽腫幹細胞では分化誘導した膠芽腫細胞よりも強い低酸素刺激により Stat5b と Lgr5 の発現が誘導されることを発見した。これには、膠芽腫幹細胞のスフェア形成による立体構造が関与していると考えられ、スフェア内部の低酸素濃度を上回る低酸素刺激を加えることが必要であったのではないかと考察する。すなわち、膠芽腫幹細胞は正常酸素条件下においてもスフェア内部では低酸素応答シグナルが活性化しており、Stat5b や Lgr5 を含む下流標的遺伝子の発現を制御することで膠芽腫幹細胞が維持されていると考えられる。

今回得られた知見から、膠芽腫組織中の Lgr5 発現細胞は、低酸素に適応した膠芽腫幹細胞集団を形成し、この細胞集団は Stat5b を高発現している可能性を示唆している。膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現は、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の阻害剤である ICG-001 の作用と Lgr5 ノックダウンにより減少した。以前に膠芽腫幹細胞における Lgr5 ノックダウンは、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路を阻害することが報告されている (26)。これらの知見は Stat5b の発現が低酸素応答シグナルと Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の両方によって調節されていることを示唆している。さらに、マウス胚性幹細胞における低酸素応答シグナル経路と Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の関連について以下の報告がされている。マウス胚性幹細胞に対する低酸素刺激により Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の下流エフェクター因子である TCF のレポーター活性が増加し、タンパク質レベルでは Hif1 $\alpha$  と  $\beta$ -Catenin および TCF/LEF などの Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の重要な転写調節因子の発現が誘導されることが明らかになっている。これらの低酸素応答シグナル経路による Wnt シグナル伝達の活性化は胚性幹細胞において認められ、分化細胞では観察されないことから、低酸素応答シグナル伝達と Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路は、協調して幹細胞の調節に寄与すると考えられている (62)。したがって、膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現も、低酸素応答シグナル伝達と Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の協力により同様に調節されている可能性が考えられる。

過去のヒト膠芽腫幹細胞を用いた研究において、Lgr5 ノックダウンにより発現が抑制される遺伝子として、VEGFA および CA9 を含む確立された低酸素関連遺伝子および膠芽腫幹細胞の調節に重要である低酸素関連遺伝子 PFKFB4 (63)、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の下流標的遺伝子産物である L1CAM (64)、Wnt 調節因子である NDRG1 (65) などの遺伝子とともに、Stat5b が同定されている (25)。これらの知見と本研究結果から、Lgr5 ノックダウンまたは Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の阻害による Stat5b の発現抑制が、ヒトおよびマウス膠芽腫幹細胞で保存されている可能性がある。したがって、低酸素応答シグナル伝達および Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の両方が Stat5b 発現の調節に関与する可能性を示唆している。

以上の結果から、低酸素応答シグナルおよび Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の下流で Stat5b の発現は誘導され、低酸素環境で維持される膠芽腫幹細胞の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。



## 第2章

### Stat5b 阻害による膠芽腫幹細胞の増殖抑制機構

#### 2-1. 緒言

過去の報告において、免疫組織化学的解析により、正常脳皮質および WHO 分類悪性度 II に相当するびまん性星細胞腫と比較して、より悪性度の高い膠芽腫において Stat5b タンパク質が高発現することが報告されている (66)。また、膠芽腫患者の腫瘍組織中におけるリン酸化 Stat5b タンパク質の発現レベルを解析した研究では、核内に集積したリン酸化 Stat5b の高発現が、不良な予後と相関することが明らかになっている (67)。したがって、膠芽腫において Stat5b の高発現および活性化が患者の不良な予後に関連するとともに、膠芽腫の生物学に重要な意味を持つ可能性がある。しかし、これまで膠芽腫幹細胞における Stat5b 機能に着目した研究は皆無であり、Stat5b の機能的役割や膠芽腫幹細胞を攻撃するための治療標的としての有効性については不明であった。そこで、本章では膠芽腫幹細胞の増殖やその腫瘍形成能に Stat5b の発現が担う役割を解明することを目的とした。

まず、膠芽腫幹細胞の生存および増殖において Stat5b が担う機能的役割を明らかにし、Stat5b を標的とした抗腫瘍効果を評価するため、マウス膠芽腫モデル由来膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現抑制が細胞増殖や生存に与える影響を解析した。続いて、Stat5b の下流で制御される遺伝子群を特定することにより、膠芽腫幹細胞の生存および増殖において Stat5b が担う機能的役割を明らかにするため、マイクロアレイ解析を実施した。

Stat5b の薬理的阻害による膠芽腫幹細胞の細胞増殖抑制効果を明らかにするため、Stat5 阻害剤 IQDMA を用いて検討した。IQDMA は、Stat5 タンパク質に直接結合することで、そのリン酸化による活性化を阻害し、過去の報告においては、ヒト白血病 HL-60 細胞と K562 細胞に対して、アポトーシスを誘導することが報告されている (68,69)。IQDMA を治療薬として用いる際の、その安全性を評価するために、正常細胞モデルとしてアストロサイトの培養系を用いて、IQDMA の処理による細胞毒性について膠芽腫幹細胞と比較することで検証した。また、IQDMA の治療薬としての有効性を検証するために、膠芽腫幹細胞の同所性移植モデルを作製し、IQDMA の全身性投与を行ない、膠芽腫の進展について生体内イメージング技術を用いて定量的に比較を行った。さらに、Stat5b の発現の有無により、膠芽腫幹細胞が保持する腫瘍形成能に与える影響を検証することを目的として、RNA 干渉法を用いた Stat5b ノックダウンを実施した膠芽腫幹細胞を作製し、同所性移植モデルにて腫瘍形成の比較と生存期間を観察した。さらに、腫瘍組織を摘出し、細胞増殖マーカーの発現レベルを免疫組織化学染色法により評価する

ことで、生体内の膠芽腫モデル組織中における膠芽腫細胞の増殖に対して Stat5b 発現が与える影響を定量的に解析した。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 細胞培養

マウス膠芽腫幹細胞の培養は第一章と同様の培地および培養条件で行った。マウスアストロサイト細胞株 C8D30 (ATCC、Manassas、VA、USA) は DMEM (Wako) に 10% FBS および 1% penicillin/streptomycin (Wako、それぞれ 100 units/mL、100 µg/mL) を加えた培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

### 2-2-2. shRNA 導入トランスフェクション条件

第一章と同様に、shRNA 発現レンチウイルスベクターを作製し使用した。Stat5b ノックダウンは、膠芽腫幹細胞を、 $1 \times 10^5$  個/well で 6 well plate に播種し、Stat5b shRNA 発現レンチウイルスベクターを MOI 10 で添加し、2~4 日間培養して行った。コントロールには第一章でも使用した Non target shRNA を使用した。第二章で新たに使用した Stat5b shRNA のクローン ID を以下の表に表す。生体内 Stat5b ノックダウン実験では、膠芽腫幹細胞を、 $1 \times 10^5$  個/well で 6 well plate に播種し、Stat5b shRNA 発現レンチウイルスベクターを MOI 10 で添加し、24 時間後に puromycin (Wako) 0.8-1.5 µg/mL で 48 時間セクションした細胞を用いた。

Target gene	TRC Clone ID
Stat5b	TRCN0000012554

### 2-2-3. 定量的リアルタイム PCR (RT-qPCR) 法

上記の条件で shRNA を導入した細胞を 1 well あたり 500 µL の TRIzol に溶解し、RNeasy mini kit を用いて第一章と同様に全 RNA 抽出物を精製し、得られた全 RNA 500 ng から、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix および Light Cycler 96 System を用いて以下のような条件で RT-qPCR を行った。cycle 1: 95°C で 60 秒、cycle 2 (x 40): 95°C で 15 秒、60°C で 60 秒。遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子 *Tubulin-b1* の mRNA 発現量を内部標準として 2- $\Delta\Delta C_q$  法を用いて算出した。第一章に加え、新たに Eurofins Genomics より購入し用いた各 Primer の配列は以下に示す。

Target		Sequence (5'→3')
<i>Cyclin E2</i>	Forward	CTGCTGCCGCCTTATGTCAT
	Reverse	TACACACTGGTGACAGCTGC

### 2-2-4. 抗体

第一章で使用した抗体に加え、ウェスタンブロッティング法の一次抗体には以下の抗体を用いた。

Name of antibody	Source/Isotype	Dilution	Product code	Company
Cyclin E2	Rabbit IgG	1:500	ab32103	Abcam
Phospho-Rb (Ser 807/811)	Rabbit IgG	1:1000	8516	CST
Caspase 3	Rabbit IgG	1:1000	9665	CST

さらに、免疫組織化学染色の一次抗体には以下の抗体を用いた。

Name of antibody	Source/Isotype	Dilution	Product code	Company
Ki-67	Rabbit IgG	1:800	12202	CST

#### 2-2-5. IQDMA の溶解および添加条件

IQDMA (ab141192, Abcam) は DMSO で溶解した。膠芽腫幹細胞を  $1.0 \times 10^5$  個/well で 6 well plate に播種した後に、終濃度から 2 倍濃度となるよう培地で希釈した IQDMA を培養液中に等量加え終濃度とし、24 時間培養した。C8D30 細胞では  $1.0 \times 10^5$  個/well で 6 well plate に播種し 24 時間後に、目的濃度となるよう培地で希釈した IQDMA を培地交換により添加し、24 時間培養した。溶媒コントロールとして、細胞培養液中に 0.05% DMSO を加えた。マウス膠芽腫モデルに対する、IQDMA の投与は終濃度 15 mg/mL となるように 10% DMSO、10% Cremophor EL (Sigma-Aldrich) および生理食塩水で投与直前に調製し、IQDMA (15 mg/kg) を膠芽腫幹細胞の移植翌日から 1 週間に 3 回腹腔内投与した。

#### 2-2-6. ウェスタンブロッティング法

Stat5b ノックダウン、もしくは IQDMA を作用させた細胞を PBS で洗浄し、遠心処理により細胞ペレットとした。回収した細胞を SDS Lysis Buffer にプロテアーゼ阻害剤および PhosSTOP EASYpac を加えたもので溶解し、氷冷させながら超音波処理にて細胞を破碎した。溶解液を 4°C、20,000 xg で 30 分間、遠心分離し、上清に含まれる可溶性のタンパク質抽出液を回収した。細胞抽出液は BCA タンパク質測定法を用いてタンパク質濃度を決定し、それぞれ 1 サンプルあたりタンパク質量として 10~30  $\mu$ g に 5x sample buffer を加え、95°C、5 分間熱変性を行い、検出するタンパク質の分子量に応じた 7%、10%、15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した。7%ゲルはウェット式 (50 V/gel 定電圧、60 分)、10%および 15%ゲルはセミドライ式 (170 mA/gel 定電流、90 分) にて PVDF メンブレンに転写した。Cyclin E2、Caspase-3、および PARP を検出する際は 5% スキムミルクを含有する TBST で室温下、1 時間ブロッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を、4°C 一晩、緩やかに振とう、もしくは、室温

で1時間、パラフィルム上で静置させ反応させた。抗体希釈液には Cyclin E2 を検出する際は Signal Enhancer HIKARI を、Caspase-3 および PARP を検出する際は 5% スキムミルクを含有する TBST を使用した。phospho-Rb を検出する際は、ブロッキングには Blocking one-P、抗体希釈液には 5% BSA を含有する TBST を用いた。ブロッキング溶液、もしくは TBST にて穏やかに振とうさせながら 5 分間、3 回洗浄した後、二次抗体を室温で 1 時間、反応させた。タンパク質の発現シグナルは、メンブレンを TBST で 5 分間、3 回洗浄したのちに TBS で 2 回洗浄し、通常は Clarity Western ECL Substrate を用い、発現量が少なく検出が困難な場合は Chemi-Lumi One Super を用いて発色させ、ChemiDoc XRS Plus の CCD カメラで検出した。

#### 2-2-7. 生細胞数の評価

膠芽腫幹細胞および C8D30 細胞の生細胞数はトリパンブルー染色法によって評価した。Stat5b ノックダウン、もしくは IQDMA を上記の条件にて作用させ、膠芽腫幹細胞ではニューロスフェアを accutase で解離後、細胞懸濁液を調製した。C8D30 細胞ではトリプシン処理後、細胞懸濁液を調製した。等量の 0.4%トリパンブルーを添加後、10  $\mu$ L を専用のスライドチャンバーにアプライし Countess II automated cell counter により計数した。トリパンブルーを排出し透明であった細胞を生細胞、トリパンブルーによって染色された細胞を死細胞として計数し、スライド中 3 カ所の計測平均値を算出した。IQDMA による膠芽腫幹細胞およびアストロサイトに対する 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は、IQDMA (0.1、0.5、1、2.5、5  $\mu$ M) を 24 時間作用させた際のコントロールに対する増殖阻害率から CalcuSyn software (version 2.11、Biosoft、Cambridge、UK) を用いて算出した。

#### 2-2-8. アポトーシス解析

MEBCYTO Apoptosis Kit を用い、アポトーシス細胞割合について解析を行った。Stat5b ノックダウン、もしくは IQDMA を上記の条件にて作用させた膠芽腫幹細胞を accutase 処理後回収し、第二章と同様の方法で行った。検出には、BD LSRFortessa X-20 cell Analyzer を用い、それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

#### 2-2-9. マイクロアレイ解析とパスウェイ解析

膠芽腫幹細胞を 1 x 10<sup>5</sup> 個/well で 6 well plate に播種し、Stat5b shRNA 発現レンチウイルスベクターもしくは Non target shRNA 発現レンチウイルスベクターを MOI 10 で添加し、48 時間培養した細胞を 1 well あたり 500  $\mu$ L の TRIzol に溶解し、RNeasy mini kit を用いて第一章と同様に全 RNA 抽出物を精製した。Agilent Technologies 社推奨プロトコルに従い全 RNA を用いて、in vitro transcription 反応により Cyanine3 標識 cRNA 合成を行った。続いて、Cyanine3 標識 cRNA を用いて断片化および SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8×60K v2 (Agilent Technologies、Palo Alto、CA、USA) へのハイブリダイゼー

ション (65°C、回転数 10 rpm、17 時間) を行った後、洗浄を行い専用スキャナーにてマイクロアレイの画像を取得し、Gene Spring ver14.9.1 software (Silicon Genetics、Redwood City、CA) により解析した。生データは 75 パーセント法により標準化した。Stat5b ノックダウンにより発現が 2 倍以上抑制された遺伝子群を WikiPathway (<https://www.wikipathways.org>) (70)を用いてパスウェイ解析を行った。マイクロアレイの生データは、Gene Expression Omnibus (GEO) データベース (GSE185873) で公開されている。

#### 2-2-10. BrdU 細胞増殖解析

APC BrdU flow kit を用い、細胞周期における DNA 合成期 (S 期) の細胞割合について解析を行った。Stat5b shRNA、もしくは IQDMA を上記の条件にて作用させた膠芽腫幹細胞を accutase 処理後回収し、第一章と同様の方法で行った。検出には、BD LSRFortessa X-20 cell Analyzer を用い、それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

#### 2-2-11. Caspase 3/7 assay

膠芽腫幹細胞および C8D30 細胞を上記のように 6 well plate に播種し IQDMA (1  $\mu$ M) を 24 時間作用させた後、acutase 処理またはトリプシン処理により回収し細胞懸濁液とした。次に、 $1 \times 10^4$  個細胞を含む 100  $\mu$ L の細胞懸濁液を 96 well plate に播種し、100  $\mu$ L の Caspase-Glo 3/7 試薬 (Promega、Madison、WI、USA) を各 well に加えた。室温で 1 時間インキュベートした後、発光を Synergy HT Microplate Reader (Bio Tek、Winooski、VT、USA) で測定し、Caspase 3/7 活性を評価した。

#### 2-2-12. 膠芽腫幹細胞のマウス大脳への同所性移植実験

$1 \times 10^3$  個のマウス膠芽腫組織由来膠芽腫幹細胞を 2  $\mu$ L PBS で懸濁し、6 週齢の性別が一致しているレシピエントマウスに麻酔下で定位固定装置と 10  $\mu$ L ハミルトンシリンジを用いて 1  $\mu$ L/分の速度で右側大脳室に注入し、注入完了後から 2 分間保持した後、緩徐に注射針を引き上げた。注入座標は、ブレグマから 2 mm 右側および 3 mm 腹側で行なった。

#### 2-2-13. 生体内発光イメージング

腫瘍形成のモニタリングは D-Luciferin (Wako) を 150 mg/kg 腹腔内投与し 10 分後に生物発光強度 (BLI) を IVIS Lumina XR imaging system (Summit Pharmaceuticals International、Tokyo、Japan) により測定し行った。IQDMA の投与実験では、無イベント生存期間をマウスの死亡、 $BLI > 1 \times 10^4$  あるいは移植当日から 20%以上の体重減少が生じるまでの期間を用いて評価した。生体内 Stat5b ノックダウン実験では、無イベント

生存期間をマウスの死亡、 $BLI > 5 \times 10^5$  あるいは移植当日から 20% 以上の体重減少が生じるまでの期間を用いて評価した。

#### 2-2-14. 免疫組織化学染色

マウス膠芽腫組織のパラフィン包埋切片 (4  $\mu$ m) をキシレンで脱パラフィンし、エタノールの濃度を段階的に下げて再水和を行なった。腫瘍組織のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色では、核をヘマトキシリン溶液に 4 分間反応させた後に、流水下で 5 分間、色出しを行ない、細胞質をエオジン溶液に 1 分間反応させた後にエタノールの濃度を段階的に上げて脱水後キシレンで透徹し、Mount-Quick を用いて封入した。腫瘍組織の Ki-67 染色では、クエン酸 Buffer (10 mM、pH 6.0) を使用して、スチームクッカーで 40 分間加熱しながら抗原賦活処理を行った。内因性ペルオキシダーゼは、3% 過酸化水素を含む TBST を 10 分間作用させることにより阻害した。BSA および正常ヤギ血清を含む TBST (1% BSA、20% Goat serum) で室温下、1 時間ブロッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を、4°C で一晩反応させた。TBST にて穏やかに振とうさせながら 5 分間、2 回洗浄した後、二次抗体を室温で 30 分間、反応させた。抗体希釈液には、Antibody Diluent with Background Reducing Components を使用した。タンパク質の発現シグナルは TBST で 5 分間、2 回洗浄した後に Envision + System and AEC を用いて発色させた。核はヘマトキシリン溶液に 30 秒間反応させた後に、流水下で 5 分間、色出しを行なった。染色後の切片は Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium を用いて封入した。Ki-67 陽性率 (%) は、 $\{(\text{Ki-67 陽性細胞数})/(\text{全細胞数})\} \times 100$  で算出した。

#### 2-2-15. 統計学的処理

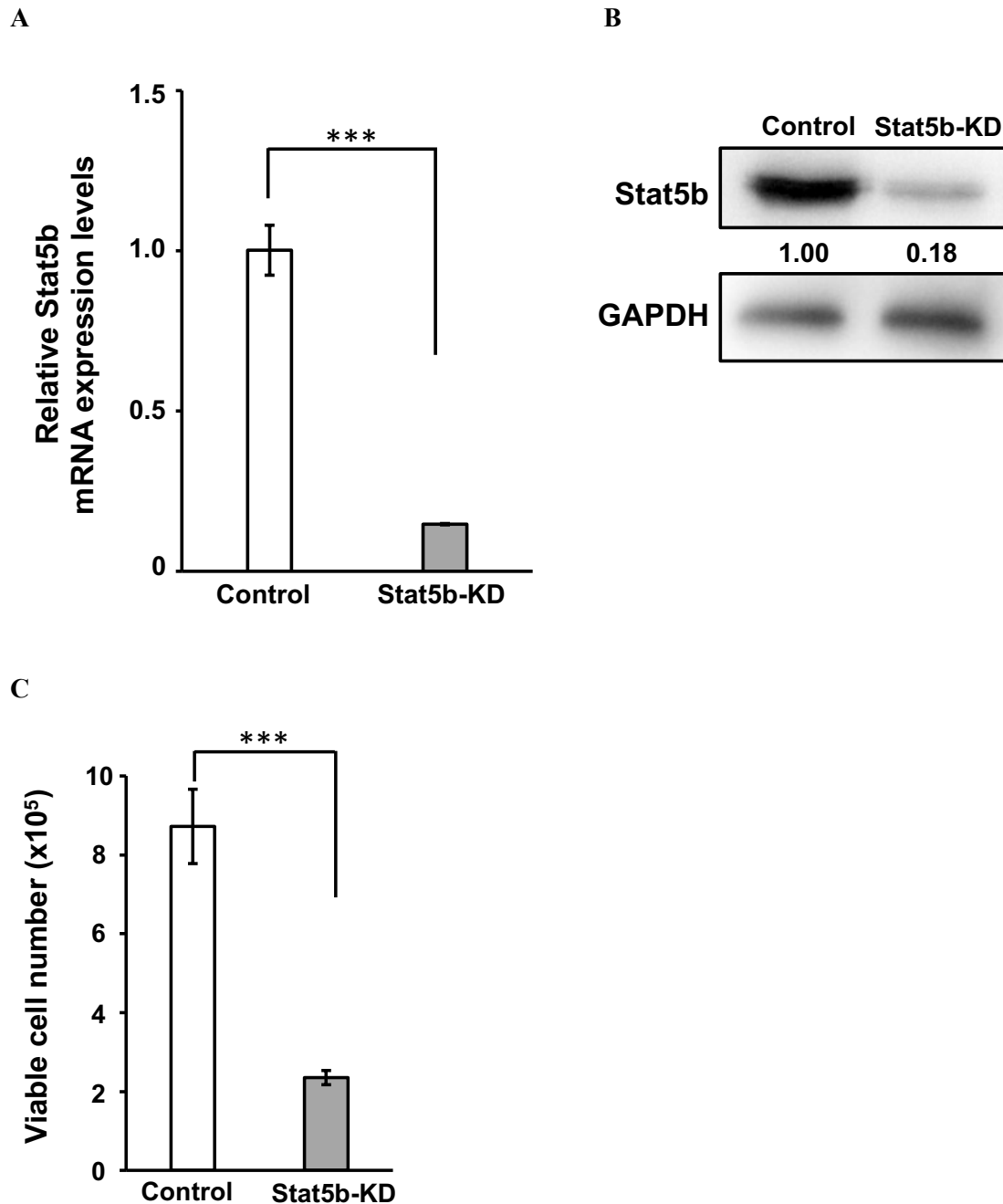
全てのデータはそれぞれ独立した 3 回以上の実験を行うことにより解析した。データは平均値  $\pm$  標準偏差 (S.D.) にて表示した。p 値はエクセル統計を用いて Student's t-test 両側検定、Dunnett の多重比較検定および 2 way ANOVA with Bonferroni 検定を行うことにより算出した。また、生存期間の検定にはログランク検定を用いた。得られた p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

## 2-3. 実験成績

### 2-3-1. Stat5b ノックダウンによる膠芽腫幹細胞の増殖に与える影響の解析

膠芽腫幹細胞の増殖および生存における Stat5b の機能を明らかにするために、レンチウイルスベクターを用いた shRNA の形質導入による RNA 干渉法を利用し、Stat5b のノックダウンを実施した。まず、コントロールと比較して、Stat5b mRNA およびタンパク質発現レベルが共に約 0.2 倍まで効率よくノックダウンされていることを RT-qPCR およびウェスタンブロッティングにより確認した (Fig. 17A and B)。この shRNA シーケンスを用いて、Stat5b のノックダウンが膠芽腫幹細胞の増殖能に与える影響を解析するために、生細胞の絶対数を比較することでその増殖を評価した。その結果、Stat5b ノックダウンにより、コントロールと比較して生細胞数が約 0.3 倍まで減少し、細胞増殖が有意に抑制されることを明らかにした (Fig. 17C)。これらの実験結果から、Stat5b タンパク質の高発現は、膠芽腫幹細胞の細胞増殖に対して促進性に機能している可能性が示唆された。



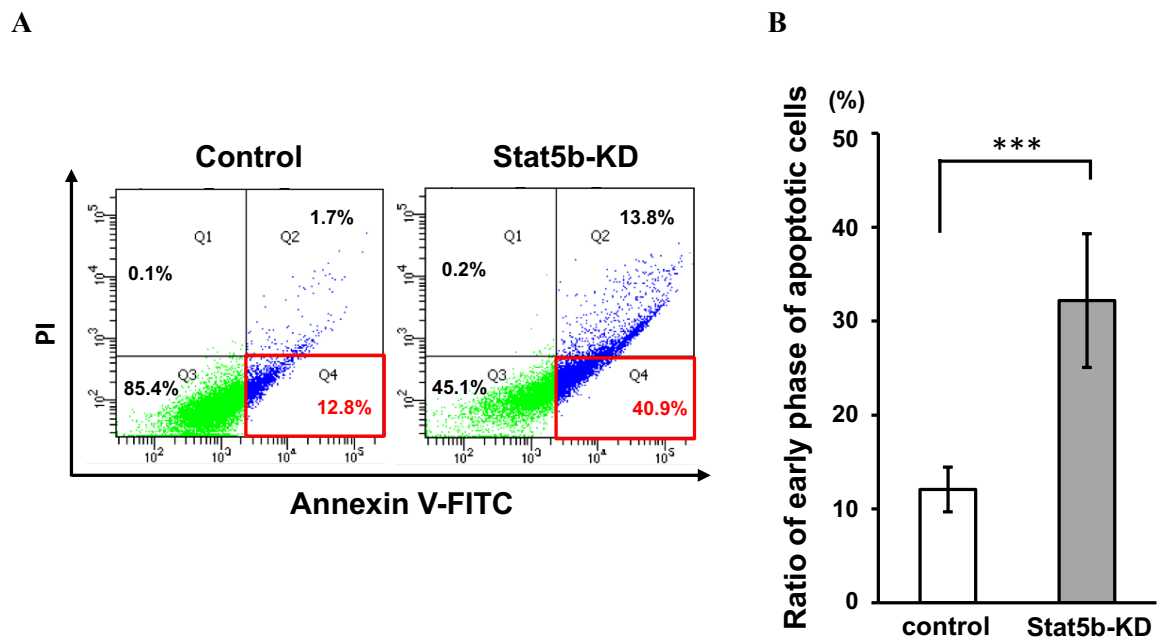


**Figure 17. Knockdown of Stat5b inhibits proliferation of GSCs.**

**A and B**, RT-qPCR and Western blot analysis of Stat5b expression in GSCs transduced lentivirally with control-shRNA (Control) or Stat5b-shRNA (Stat5b-KD). GAPDH is shown as a loading control. Relative band intensity is shown. **C**, GSCs were treated with control-shRNA (Control) or Stat5b-shRNA (Stat5b-KD) for 3 days, and the number of viable cells was determined (n=4; \*\*\*P<0.001). These figures were cited from Figure 3 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 2-3-2. Stat5b ノックダウンによる膠芽腫幹細胞のアポトーシス誘導効果の解析

前項にて明らかにした、Stat5b ノックダウンによる膠芽腫幹細胞の細胞増殖抑制機構に、アポトーシスの誘導が関与するのかどうか検証するために、フローサイトメーターを用いた Annexin V/PI 染色法によりアポトーシス細胞割合の定量解析を実施した。その結果、Stat5b ノックダウンにより、赤枠 Q4 ゲート内の Annexin V 陽性/PI 陰性の早期アポトーシス細胞の割合がコントロールと比較して約 3 倍に増加することを確認した (Fig. 18A and B)。これらの結果から、Stat5b ノックダウンによる細胞増殖抑制には、アポトーシスの誘導が関与している可能性が示唆された。すなわち、Stat5b の高発現は、膠芽腫幹細胞の生存を維持するうえで、重要な機能を担う可能性が示唆された。

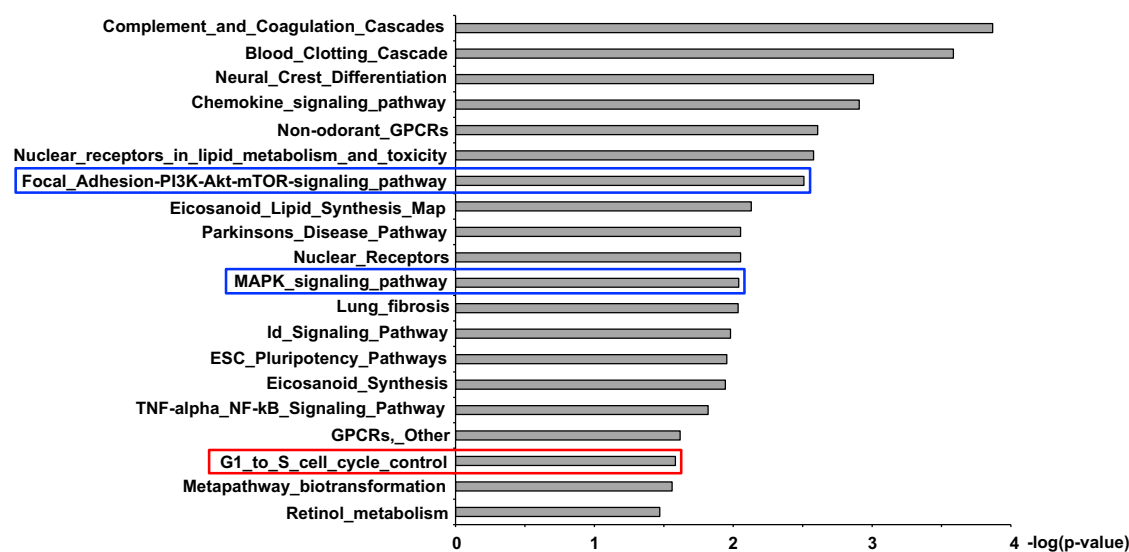


**Figure 18. Knockdown of Stat5b inhibits proliferation of GSCs.**

**A and B**, GSCs were treated with control-shRNA (Control) or Stat5b-shRNA (Stat5b-KD) for 3 days, and Annexin V-positive PI-negative apoptotic cells were detected by flow cytometry (n=6; \*\*\*P<0.001). These figures were cited from Figure 3 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 2-3-3. 膠芽腫幹細胞において Stat5b ノックダウンにより抑制性の影響を受ける経路の同定

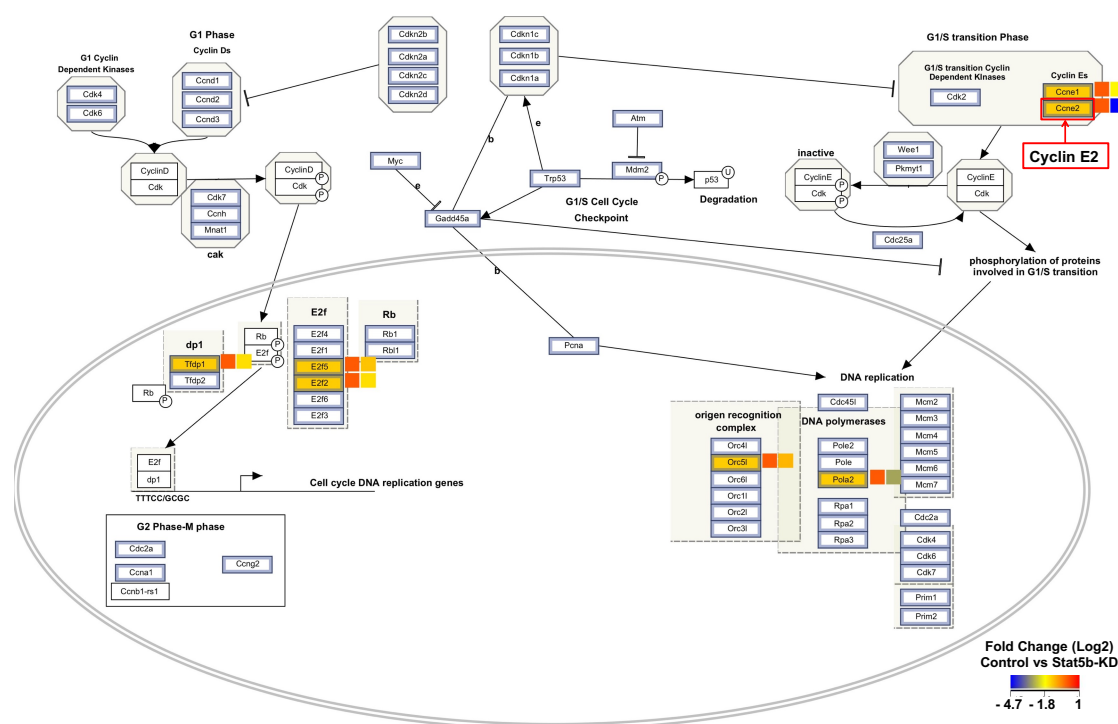
次に、膠芽腫幹細胞における Stat5b ノックダウンに伴って、特に抑制される重要なシグナル経路を明らかにするために、Stat5b をノックダウンした膠芽腫幹細胞を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。Stat5b ノックダウンにより 2 倍以上発現が抑制された遺伝子群を用いてパスウェイ解析を実施することで、Stat5b ノックダウンにより抑制性の影響を受ける上位 20 の経路を抽出した。その結果、青枠で示す EGF などの増殖因子下流で細胞の生存の促進に寄与する PI3K/Akt/mTOR 経路や、細胞増殖に対して促進性の寄与を果たす MAPK 経路とともに、赤枠で示す G1 期から S 期への細胞周期進行に関連する G1 to S cell cycle 経路が有意に抑制されることを明らかにした (Fig. 19)。これらの結果から、Stat5b の高発現が、細胞周期の制御に関与していることにより、増殖を正に制御している可能性が示唆された。



**Figure 19. Enriched pathways of the downregulated genes by Stat5b knockdown in GSCs.** Pathway analysis of genes downregulated by Stat5b knockdown (fold change >2) is shown. The G1 to S cell cycle pathway is detected among top 20 regulated pathways (P=0.026). This figure was cited from Supplementary Figure 3 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

## 2-3-4. 膠芽腫幹細胞において Stat5b ノックダウンにより発現抑制される細胞周期経路関連遺伝子の同定

Stat5b ノックダウンにより G1 to S cell cycle 経路が有意に抑制されたことから、本経路を構成する細胞周期関連遺伝子の発現変動をさらに探索した。その結果、赤枠で示す Cyclin E2 (Ccne2) の発現がコントロールと比較して Stat5b ノックダウンにより約 0.04 倍まで抑制されていることを明らかにした (Fig. 20)。Cyclin E2 は CDK2 と結合し、Rb のリン酸化による活性化を誘導し、E2F 転写因子の機能を促進することにより、細胞周期における G<sub>1</sub> 期から S 期への移行を促進性に制御する。したがって、Stat5b は、この Cyclin E2 の発現を制御し、膠芽腫幹細胞の細胞周期の進行を調節することで、その増殖を制御している可能性が示唆された。

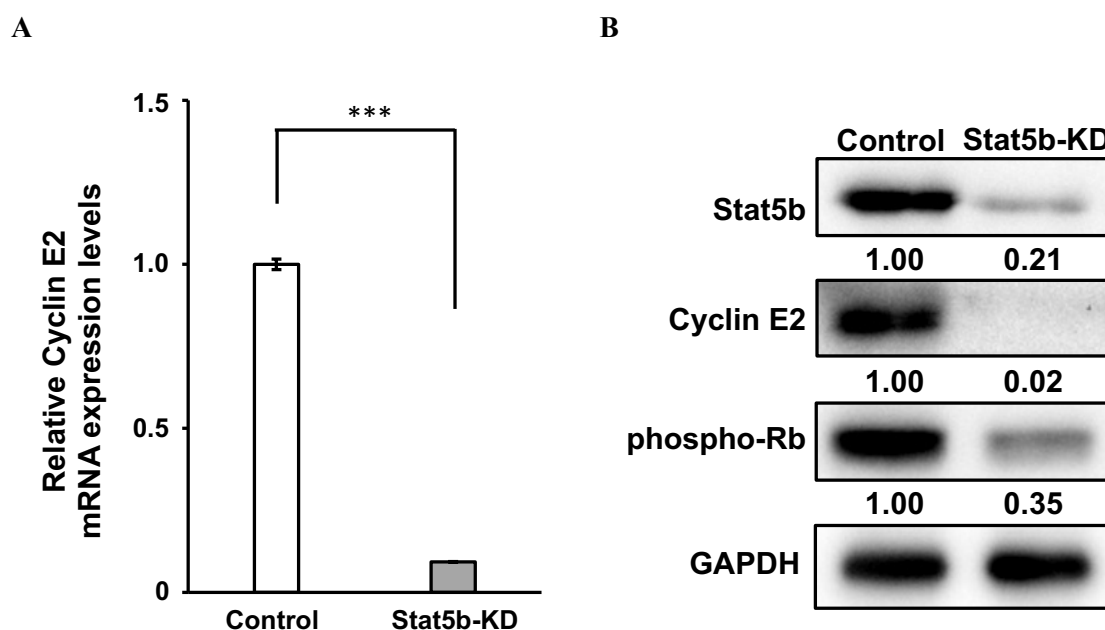


**Figure 20. Signal diagram of G1 to S cell cycle pathway.**

Expression of Cyclin E2 is markedly downregulated by Stat5b knockdown among the cell cycle regulators. control-shRNA (Control), left; Stat5b-shRNA (Stat5b-KD), right. This figure was cited from Supplementary Figure 4 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 2-3-5. 膠芽腫幹細胞における Stat5b ノックダウンが細胞周期関連遺伝子の発現に与える影響の解析

マイクロアレイ解析により、膠芽腫幹細胞における Stat5b のノックダウンによって、発現が抑制される遺伝子として、Cyclin E2 を同定した。その効果の再現性を検証するために、他の複数の方法により Cyclin E2 の発現レベルを検証した。Cyclin E2 mRNA の発現レベルを、RT-qPCR により解析したところ、コントロールと比較して Stat5b ノックダウンにより約 0.1 倍まで発現が抑制されることを確認した (Fig. 21A)。ウェスタンブロッティング解析では、Stat5b ノックダウンにより Cyclin E2 タンパク質発現レベルが約 0.02 倍、細胞周期の重要な制御因子であるリン酸化 Rb のタンパク質発現レベルが約 0.4 倍まで抑制されることを確認した (Fig. 21B)。以上の結果より、膠芽腫幹細胞において、Stat5b ノックダウンは Cyclin E2 の発現を抑制し、Rb タンパク質のリン酸化の抑制に帰着していることが明らかとなった。

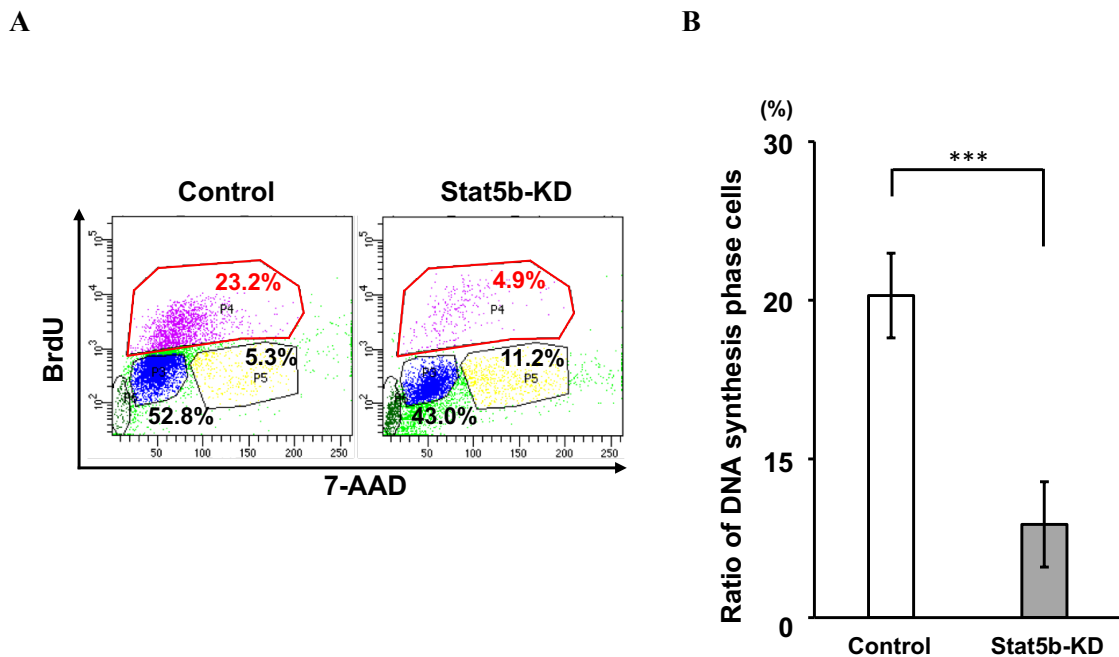


**Figure 21. Stat5b knockdown downregulates the expression of Cyclin E2 and blocks cell-cycle progression in GSCs.**

**A**, GSCs were treated with control-shRNA (Control) or Stat5b-shRNA (Stat5b-KD) for 2 days, and Cyclin E2 expression levels were analyzed by RT-qPCR (n=3; \*\*\*P<0.001). **B**, Western blot analysis of Stat5b, Cyclin E2, and Phospho-Rb in GSCs treated with shRNA for 3 days. GAPDH is shown as a loading control. Relative band intensity is shown. These figures were cited from Supplementary Figure 5 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 2-3-6. 膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現低下が細胞周期に与える影響の解析

前項により、Stat5b の発現低下は、膠芽腫幹細胞の細胞周期進行を Rb タンパク質のリン酸化の抑制を介して抑制的に制御している可能性が示唆された。そこで、BrdU の取り込みをフローサイトメーターで解析することで、細胞周期における DNA 合成期にエンタリーする細胞の割合を評価した。その結果、Stat5b ノックダウンによりコントロールと比較して、赤枠 P4 ゲート内の BrdU 陽性の DNA 合成期にエンタリーした細胞の割合が約 0.3 倍まで有意に減少した (Fig. 22A and B)。以上の結果から、膠芽腫幹細胞において、Stat5b の発現低下は Cyclin E2 の発現を抑制し、Rb タンパク質のリン酸化の抑制を伴って、細胞周期の DNA 合成期への進行を阻害し、細胞増殖を抑制する可能性が示唆された。



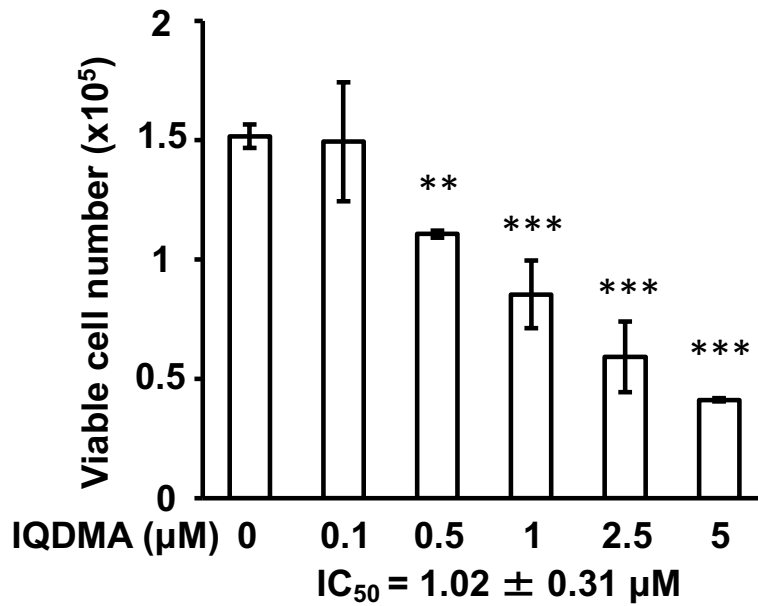
**Figure 22. Stat5b knockdown downregulates the expression of Cyclin E2 and blocks cell-cycle progression in GSCs.**

**A and B,** GSCs were treated with the shRNA for 3 days and the ratio of the BrdU incorporating cells (P4) was assessed by flow cytometry (n=4; \*\*\*P<0.001). These figures were cited from Supplementary Figure 5 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

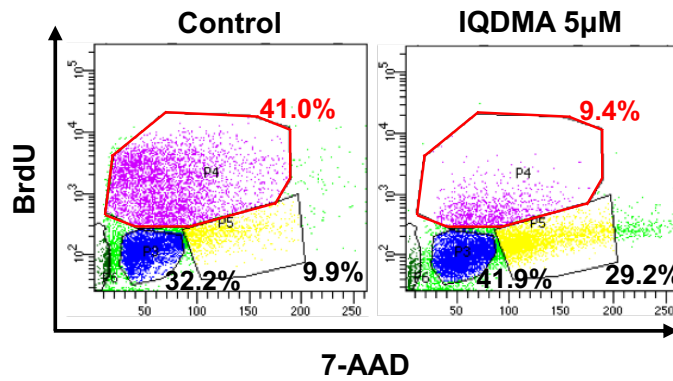
### 2-3-7. Stat5 阻害剤 IQDMA による膠芽腫幹細胞の増殖への影響の解析

Stat5b の人為的発現抑制により膠芽腫幹細胞の細胞周期進行が抑制され、その増殖を効率よく阻害できることが明らかになった。そこで、Stat5b の治療標的としての有用性を検証することを目的として、過去の文献で Stat5 阻害剤として報告されている IQDMA (N'-(11H-indolo[3,2-c]quinolin-6-yl)-N,N-dimethylethane-1,2-diamine) (68) を膠芽腫幹細胞に作用させ、その表現型を解析した。IQDMA を 0.1  $\mu\text{M}$  から 5  $\mu\text{M}$  の濃度で膠芽腫幹細胞に 24 時間作用させ、生細胞数を計測することで増殖を評価した。その結果、コントロールと比較して IQDMA 0.5  $\mu\text{M}$  の濃度において増殖が約 30% 阻害され、5  $\mu\text{M}$  の濃度では約 70% 有意に増殖が阻害されることを確認した (Fig. 23A)。また、膠芽腫幹細胞に対する IQDMA の  $\text{IC}_{50}$  を算出した結果、 $1.02 \pm 0.31 \mu\text{M}$  であった。さらに、IQDMA を 5  $\mu\text{M}$  の濃度で膠芽腫幹細胞に 24 時間作用させ、BrdU の取り込みをフローサイトメーターで解析することによって、DNA 合成期にエントリーする細胞の割合を評価した。その結果、IQDMA の処理によりコントロールと比較して、赤枠 P4 ゲート内の BrdU 陽性の DNA 合成期にエントリーした細胞の割合が約 0.3 倍まで有意に減少した (Fig. 23B and C)。これらの結果は、Stat5b ノックダウンによる発現抑制で得られた結果と合致しており (Fig. 22A and B)、Stat5b の機能を IQDMA 処理により薬理的に阻害すると、膠芽腫幹細胞の増殖および細胞周期の進行が阻害される可能性が示唆された。

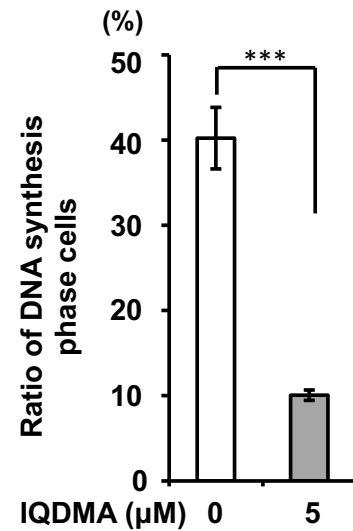
A



B



C



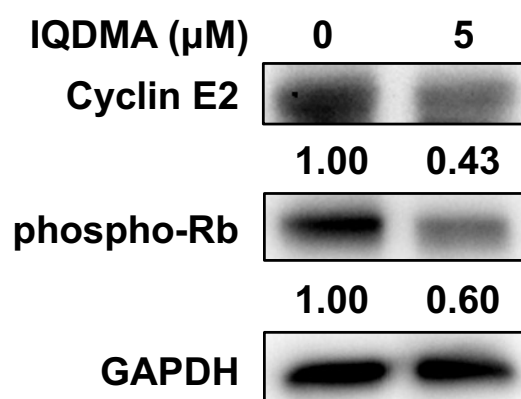
**Figure 23. Treatment with the Stat5 inhibitor IQDMA suppresses GSC proliferation.**

**A**, GSCs were treated with DMSO (Control) or IQDMA (0.1, 0.5, 1, 2.5, and 5 μM) for 24 h, and the number of viable cells was counted (n=3; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001). **B and C**, The percentage of BrdU-incorporated cells (P4) treated with DMSO (Control) or IQDMA (5 μM) for 24 h was determined by flow cytometry (n=3; \*\*\*P<0.001). These figures were cited from Figure 4 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.



### 2-3-8. Stat5 阻害剤 IQDMA が膠芽腫幹細胞において細胞周期関連遺伝子の発現に与える影響の解析

膠芽腫幹細胞における Stat5b ノックダウンにより Cyclin E2 およびリン酸化 Rb の発現抑制が確認されたことから、IQDMA による Stat5b の薬理的機能阻害においても、これらの発現が抑制されるかどうかウェスタンブロッティングにより検証した。その結果、IQDMA を 5  $\mu$ M の濃度で 24 時間作用させることにより、Stat5b ノックダウンで得られた結果 (Fig. 21B) と同様に、Cyclin E2 の発現レベルが約 0.4 倍に、リン酸化 Rb の発現レベルが約 0.6 倍に抑制されることを確認した (Fig. 24)。以上の結果から、膠芽腫幹細胞において Stat5b の発現抑制および Stat5b の薬理的機能阻害は共に、Cyclin E2 の発現抑制とそれに伴う Rb のリン酸化の抑制をもたらし、細胞周期の進行を阻害することで、細胞増殖を抑制することが示唆された。



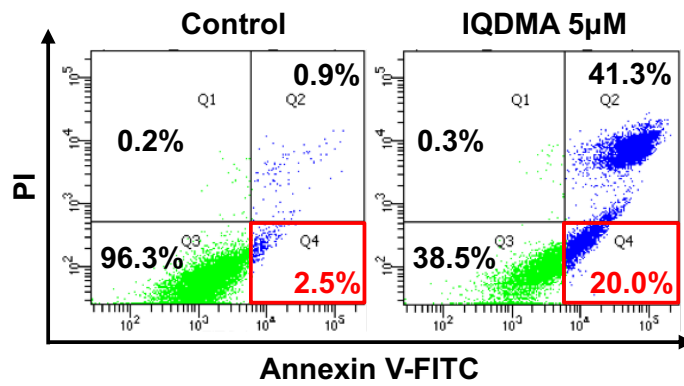
**Figure 24. Treatment with the Stat5 inhibitor IQDMA downregulates the expression of Cyclin E2 and phospho-Rb in GSCs.**

Western blot analysis of Cyclin E2 and phospho-Rb in GSCs treated with DMSO or IQDMA (5  $\mu$ M) for 24 h. GAPDH is shown as a loading control. Relative band intensity is shown. This figure is unpublished data.

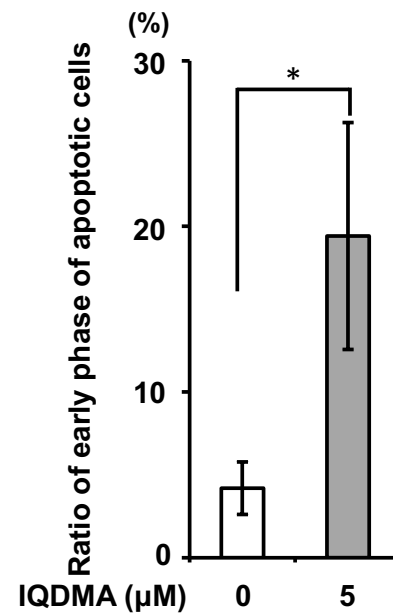
### 2-3-9. Stat5 阻害剤 IQDMA による膠芽腫幹細胞におけるアポトーシスの誘導効果の解析

膠芽腫幹細胞における Stat5b ノックダウンによりアポトーシスの誘導が確認されたことから (Fig. 18A and B)、IQDMA を作用させることによる Stat5b の薬理的機能阻害においても、アポトーシスが誘導されるかどうか検証した。IQDMA を 5  $\mu$ M の濃度で 24 時間作用させ Annexin V/PI 染色によるアポトーシス解析を実施した結果、IQDMA 処理により赤枠 Q4 ゲート内の Annexin V 陽性/PI 陰性の早期アポトーシス細胞割合が約 5 倍に有意に増加した (Fig. 25A and B)。さらに、IQDMA の作用により、アポトーシスの指標となる Caspase 3 および PARP タンパク質の切断が、ウェスタンブロッティングにより観察され、さらにリン酸化 Stat5 の発現レベルが約 0.3 倍まで減少することを確認した (Fig. 25C)。以上の結果から、Stat5b ノックダウンにより確認された表現型が、IQDMA 処理による Stat5b の薬理的機能阻害でも示され、膠芽腫幹細胞において Stat5b の機能を阻害するとアポトーシスの誘導を伴った細胞増殖抑制が引き起こされることが裏付けられた。したがって、Stat5b が膠芽腫幹細胞の効果的な治療標的となりうること、さらに、IQDMA は膠芽腫幹細胞に対する有用な治療薬となりうる可能性が示唆された。

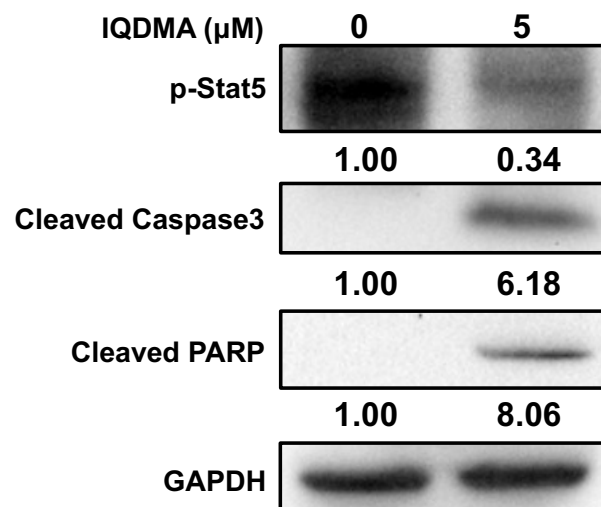
A



B



C

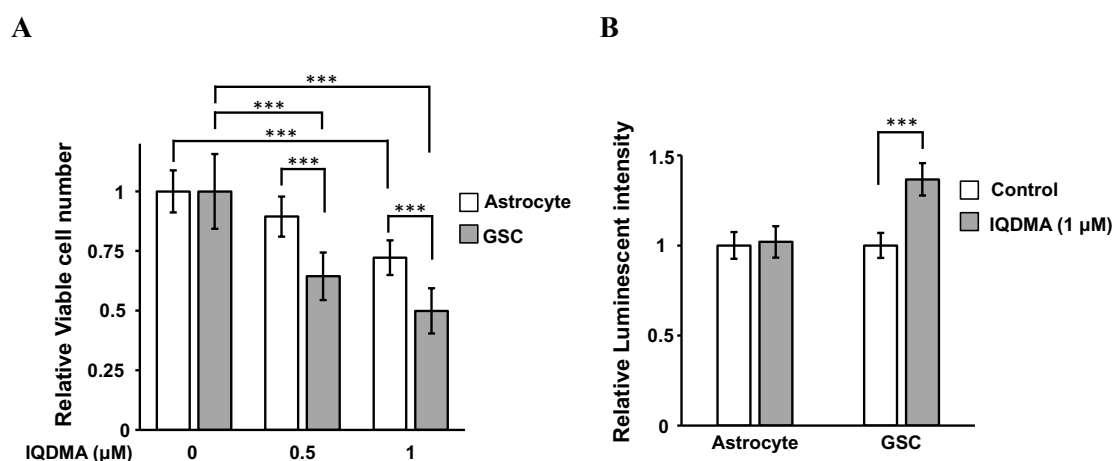


**Figure 25. Treatment with the Stat5 inhibitor IQDMA induces apoptosis in GSCs.**

**A and B,** Flow cytometric analysis of Annexin V/PI staining for the detection of apoptosis in GSCs treated with DMSO (Control) or IQDMA (5  $\mu$ M) for 24 h (n=4; \*P<0.05). **C,** Western blot analysis of phospho-Stat5b, Caspase 3, and PARP in GSCs treated with DMSO or IQDMA (5  $\mu$ M) for 24 h. GAPDH is shown as a loading control. Relative band intensity is shown. These figures were cited from Figure 4 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

## 2-3-10. マウスアストロサイトに対する Stat5 阻害剤 IQDMA による細胞毒性の解析

IQDMA の正常細胞に対する毒性を評価しその安全性に関する知見を得るために、マウス膠芽腫幹細胞と対比させることにより、マウスアストロサイトに対する細胞増殖阻害効果およびアポトーシスの誘導効果について比較検討した。膠芽腫幹細胞およびアストロサイトに対する IQDMA の  $IC_{50}$  は、それぞれ  $1.02 \pm 0.31 \mu M$  および  $1.91 \pm 0.34 \mu M$  であり、両細胞間での IQDMA による増殖阻害効果を比較すると、増殖は膠芽腫幹細胞でより低い濃度で抑制された (Fig. 26A)。また、膠芽腫幹細胞に対する  $IC_{50}$  ( $1 \mu M$ ) における、Caspase 3/7 の活性化を評価したところ、アストロサイトでは、Caspase 3/7 の有意な活性化がみられないのに対し、膠芽腫幹細胞では有意な活性化が確認された (Fig. 26B)。以上の結果より、IQDMA はアストロサイトと比較し、膠芽腫幹細胞においてより低濃度で細胞増殖阻害活性を示すことから、膠芽腫幹細胞を標的とした治療薬として有効性が期待できる可能性が示唆された。

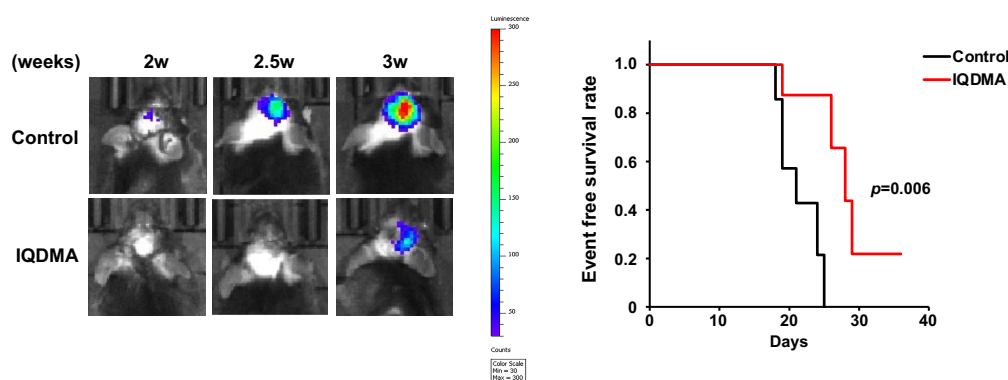


**Figure 26. Selective cytotoxicity of IQDMA on GSCs.**

**A**, Non-cancerous astrocytes and GSCs were treated with IQDMA (0.5, 1  $\mu M$ ) for 24 h, and the number of viable cells was counted ( $n=9$ ; \*\*\* $P<0.001$ ). **B**, Astrocytes and GSCs were treated with IQDMA (1  $\mu M$ ) for 24 h, and Caspase 3/7 enzymatic activity was measured ( $n=3$ ; \*\*\* $P<0.001$ ). These figures were cited from Supplementary Figure 6 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 2-3-11. 生体内マウス膠芽腫モデルに対する Stat5 阻害剤 IQDMA による抗腫瘍効果の解析

Stat5 阻害剤 IQDMA による膠芽腫幹細胞に対する増殖抑制効果およびアポトーシスの誘導を認めたことから、その *in vivo* における抗腫瘍効果を検証した。マウス膠芽腫幹細胞の同所性移植モデルに対して、IQDMA を全身性に投与し、腫瘍の進展を生体内発光イメージングにより評価した。IQDMA を 15 mg/kg の用量で、膠芽腫幹細胞の移植翌日から、1 週間に 3 回、腹腔内投与した結果、コントロール群では投与開始 2 週目から発光シグナルが観察された。さらに、コントロール群では 25 日目の時点で生存率が 0% となったのに対し、IQDMA 投与群では投与開始 3 週目から発光シグナルを呈したが、腫瘍の成長を抑制することで、コントロールと比較して生存期間の有意な延長を認めた (Fig. 27A and B)。IQDMA 投与はさらなる体重減少などの明らかな副作用は起こさなかった。以上の結果より、本膠芽腫マウスモデルでの検討により、IQDMA は膠芽腫に対する抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。



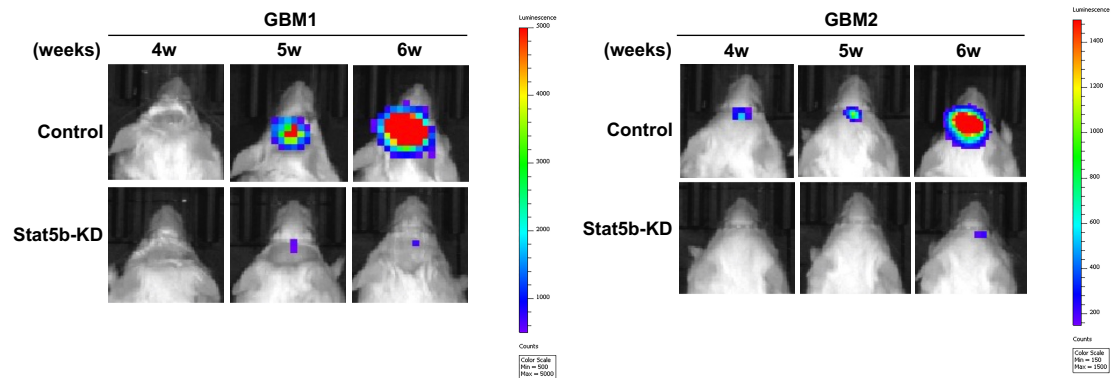
**Figure 27. IQDMA suppresses tumorigenicity of GSCs in vivo.**

**A**, Representative bioluminescent images from Control and IQDMA treatment groups at 2, 2.5 and 3 weeks after the GSC transplantation. **B**, Event-free survival of mice with GBM xenografts treated with DMSO (Control; n=7) or IQDMA (15 mg/kg; n=8) was analyzed by the Kaplan-Meier method. These figures were cited from Figure 5 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

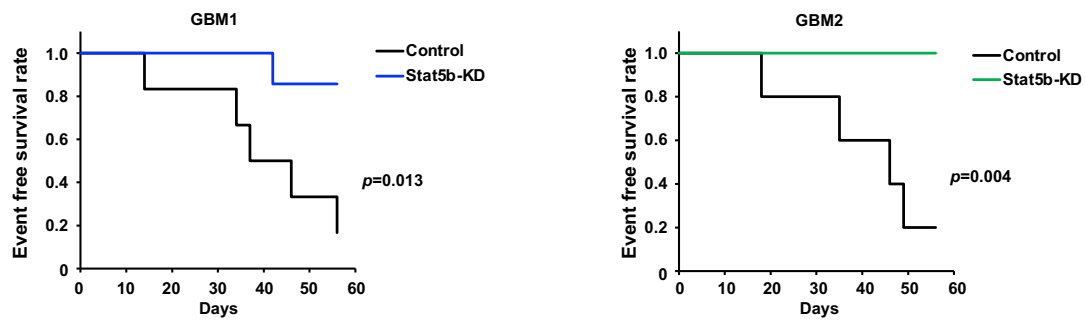
#### 2-3-12. 生体内マウス膠芽腫モデルにおいて Stat5b ノックダウンが腫瘍形成能に与える影響の解析

Stat5 阻害剤 IQDMA による有意な治療効果が観察されたことから、Stat5b の高発現が膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能に促進性の影響を与えるのではないかという仮説を立てた。これを検証するために、まず別個体由来マウス膠芽腫幹細胞に対してそれぞれレンチウイルスベクターを用いて導入した shRNA により Stat5b を安定的にノックダウンした膠芽腫幹細胞を作製した。この膠芽腫幹細胞をそれぞれ系統および性別の一致したレシピエントマウス (GBM1、GBM2) の大脳に同所性に移植し、その腫瘍形成能を評価した。その結果、GBM1 では、コントロール群において移植後 5 週目の時点で強い発光シグナルが観察され、56 日目の時点で生存しているマウスは 1 例のみであった。一方、Stat5b ノックダウン群では発光シグナル強度から腫瘍形成能が抑制されていることが観察され、56 日目の時点で死亡したマウスは 1 例のみであった (Fig. 28A and B; GBM1)。同様に、GBM2 ではコントロール群において移植後 4 週目の時点で発光シグナルが観察され、56 日目の時点で生存しているマウスは 1 例のみであった。一方、Stat5b ノックダウン群では発光シグナル強度から腫瘍形成能が抑制されていることが観察され、56 日目の時点で死亡したマウスは存在しなかった (Fig. 28A and B; GBM2)。Stat5b ノックダウンはさらなる体重減少や重篤な副作用を起こさなかった。これらの結果から、Stat5b の高発現は、本膠芽腫マウスモデルにおいて、膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能に重要な機能を果たすことが明らかとなった。

A



B



**Figure 28. Stat5b knockdown suppresses tumorigenicity of GSCs in vivo.**

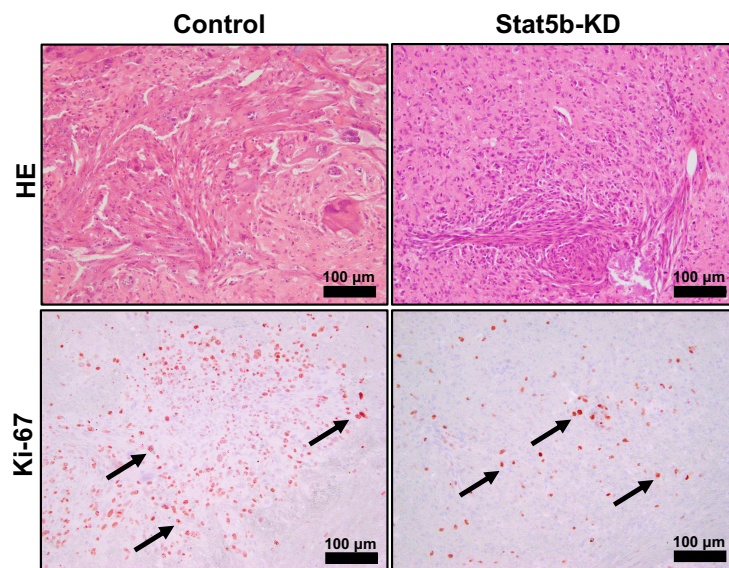
**A and B,** Representative bioluminescent images and event-free survival of mice transplanted with GSCs transduced with control-shRNA (control) or Stat5b-shRNA (Stat5b-KD) was analyzed by the Kaplan-Meier method. Two independent lines of GSCs, GBM1 (Control; n=6, Stat5b-KD; n=7), and GBM2 (Control; n=5, Stat5b- KD; n=7) were analyzed. These figures were cited from Figure 5 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

### 2-3-13. 生体内マウス膠芽腫モデルにおいて Stat5b ノックダウンが膠芽腫細胞の増殖活性に与える影響の解析

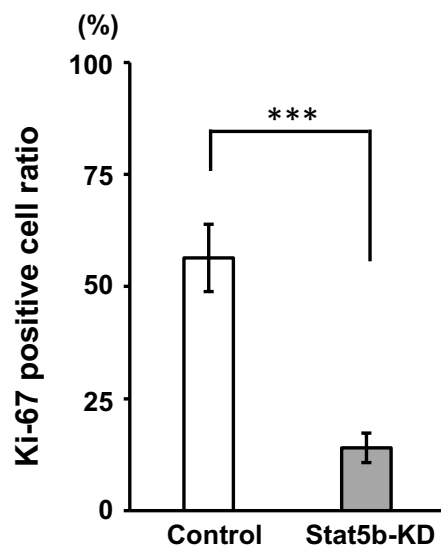
生体内マウス膠芽腫モデルにおいて、Stat5b のノックダウンが膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能を有意に抑制し、生存期間の有意な延長を示したことから、腫瘍組織中における膠芽腫細胞の増殖活性を Stat5b のノックダウンが抑制しているのではないかという仮説を立てた。これを検証するために、膠芽腫細胞の増殖活性を細胞周期にエントリーしている細胞を標識する Ki-67 の免疫組織化学染色により評価した。膠芽腫幹細胞移植群からそれぞれ腫瘍を摘出し、HE 染色による腫瘍の確認と Ki-67 染色による膠芽腫細胞の増殖活性を評価した。Stat5b ノックダウンにより、(→) で示す Ki-67 陽性細胞の割合がコントロール群と比較して約 0.25 倍まで有意に減少し、腫瘍細胞の増殖能が低下していることを確認した (Fig. 29A and B)。これらの結果から、Stat5b の高発現は、生体内マウス膠芽腫モデルにおいて、膠芽腫細胞の分裂増殖に重要な機能を果たす可能性が示唆され、また、Stat5b は治療標的分子として有効である可能性が示唆された。



**A**



**B**



**Figure 29. Stat5b knockdown suppresses tumorigenicity of GSCs in vivo.**

**A**, Hematoxylin and eosin staining and Ki67 immunostaining of xenograft tissue are shown. **B**, Quantitative analysis of Ki-67-positive cells (Control; n=4, Stat5b-KD; n=3, \*\*\*P<0.001). Arrows indicate Ki-67-positive cells. These figures were cited from Figure 5 in Moyama C et al. *Am J Cancer Res.* **2022**, 12, 1129-1142.

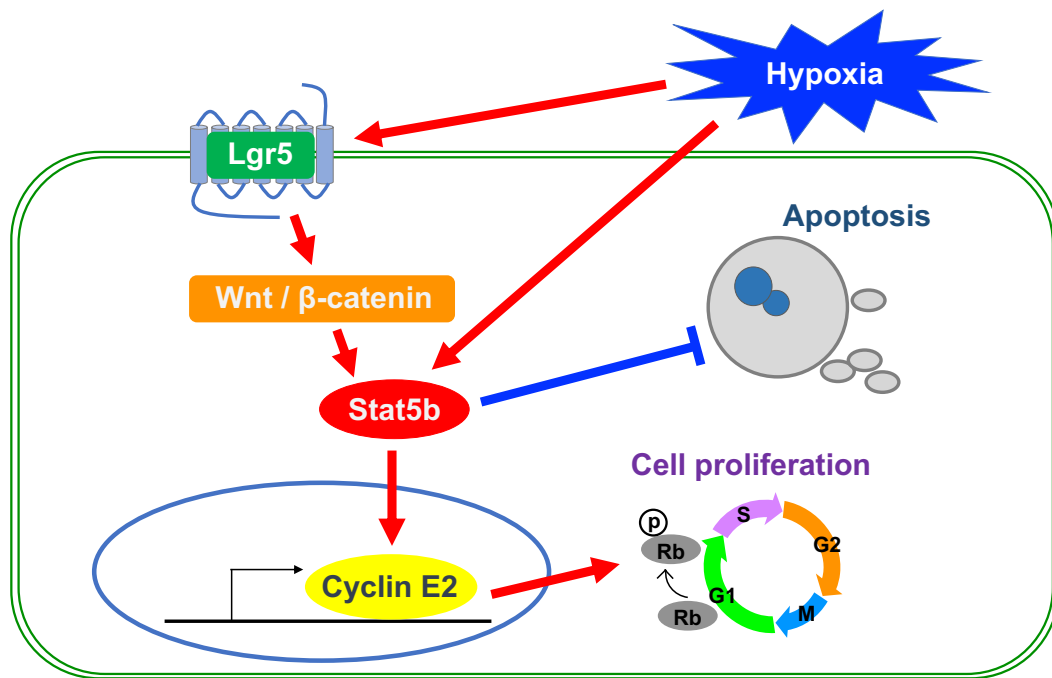
## 2-4. 考察

本章では、Stat5b のノックダウンによる機能阻害、または阻害剤化合物を用いた Stat5 の活性化阻害による、*in vitro* および *in vivo* における抗腫瘍効果に関する解析を行った。膠芽腫幹細胞における Stat5b のノックダウンは、有意に細胞増殖を抑制し、さらにアポトーシスを誘導した。これらの結果は、本膠芽腫モデルにおける膠芽腫幹細胞の生存と維持に、Stat5b が重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、Stat5b のノックダウンは、細胞周期を制御する経路を有意に抑制する遺伝子発現パターンの変動をもたらした。この変動には、細胞周期を促進する因子である Cyclin E2 の、mRNA レベルおよびタンパク質レベルでの発現減少が伴っており、結果的に、Rb タンパク質のリン酸化の抑制を伴った細胞周期停止をもたらした。過去の文献上、ヒト膠芽腫の培養細胞株で Stat5b をノックダウンすると、細胞周期が G1 期で停止することが示されており (71)、この知見は、Stat5b が膠芽腫細胞の増殖を促進性に制御していることを裏付けている。また、Stat5b ノックダウンによるアポトーシスの誘導メカニズムについて、本研究で用いたマイクロアレイ解析の結果、がん遺伝子である Myb を Stat5b 下流で促進性に制御される遺伝子として同定している (72)。過去の報告では Myb ノックダウンがヒト T 細胞性白血病細胞である Jurkit およびヒト慢性骨髄性白血病細胞である K562 細胞で Annexin V 陽性細胞および Caspase 3 の分裂の増加を引き起こすことが示されている (73)。そこで、本膠芽腫幹細胞において Myb を強制発現させ Stat5b ノックダウンを実施した検討では、Stat5b ノックダウンによる細胞増殖抑制効果およびアポトーシスの誘導効果が Myb の強制発現により有意に阻害されることを報告している (72)。したがって、膠芽腫幹細胞において、Stat5b ノックダウンによる細胞増殖抑制およびアポトーシスの誘導には Myb の発現抑制が関与すると示唆される。

Stat5 阻害剤である IQDMA は、Stat5 タンパク質に結合することにより、そのリン酸化による活性化を阻害することが報告されている (68)。膠芽腫幹細胞に対する IQDMA の処理による抗腫瘍活性を検証した結果、Stat5b ノックダウンで得られた結果と同様に、IQDMA が細胞周期の進行を有意に抑制し、この現象には、アポトーシスの誘導が伴うことが明らかとなった。IQDMA 処理によるアストロサイトに対する毒性の評価では、膠芽腫幹細胞に対し Caspase 3/7 活性増加を示す濃度において、アストロサイトへの Caspase 3/7 活性変化が認められなかった。この知見から、膠芽腫幹細胞に対する有効濃度における IQDMA の正常細胞への安全性が示された。IQDMA の膠芽腫幹細胞とアストロサイトに対する感受性が異なる理由として、Stat5b の発現レベルや活性化状態に差が生じている可能性が考えられる。すなわち、膠芽腫組織中の微小壊死組織周囲の低酸素環境下で維持される膠芽腫幹細胞では、低酸素応答シグナルおよび Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路下流で Stat5b の発現誘導とリン酸化による活性化が亢進し、細胞生存や増殖に対する Stat5b への依存度に差異が生じていることが示唆される。さらに、IQDMA をマウ

ス膠芽腫モデルに投与した検討では、腫瘍の進展が抑制され、生存期間が有意に延長した。過去の文献上では、Stat5b ノックアウトマウスにおいて脳下垂体からの成長ホルモン分泌低下とマウスの成長阻害が示されている (74)。また、Stat5a/b ダブルノックアウトマウスにおいては造血障害などが示されているため (75)、発生段階においては Stat 阻害が正常の発生過程を障害する危険性がある可能性が示唆される。一方で、乳腺の発達において、Stat5 の発現が重要な機能を担うが、その責任分子としては Stat5b よりも Stat5a の寄与が高いとの知見が得られている (76)。中枢神経系腫瘍である膠芽腫において、Stat5b の阻害による神経細胞への障害も懸念する必要があると考えられる。アストロサイトを含む非がん組織における Stat5b の発現レベルや、細胞増殖や生存における Stat5b の寄与については不明な点が多く、膠芽腫以外の組織に発現する Lgr5 陽性幹細胞での Stat5b 発現レベルなどを証明する知見についても十分蓄積されていない。そのため、Stat5b を阻害した際に生じる可能性の高い副作用に関する安全性試験等さらなる検討が必要である。しかし、本研究結果は、成体マウスにおける膠芽腫に対する新しい治療戦略として、IQDMA を用いた Stat5 の機能の阻害という治療法は、安全に遂行できる可能性を示唆している。

また、Stat5b をノックダウンした膠芽腫幹細胞の移植では、コントロール群と比較して腫瘍形成が抑制されホストとなるマウスの生存期間の有意な延長をもたらした。また、腫瘍組織の免疫組織化学的分析においても Ki-67 染色により、Stat5b ノックダウン群における細胞増殖の有意な阻害を認めた。これらの結果は、Stat5b が *in vivo* で膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能の促進に不可欠であり、また Stat5b が膠芽腫組織中における腫瘍細胞の増殖を促進性に制御している可能性を示唆している。これらの知見と本研究結果から、膠芽腫幹細胞において、低酸素応答シグナルおよび Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路下流で促進性に制御される Stat5b は、Cyclin E2 の発現を促進性に制御することで細胞周期の進行と細胞増殖を促進し、同時にアポトーシスの誘導も制御する機能を担っていると考えられる (Fig. 30)。また *in vivo* において腫瘍形成を促進する機能を担っており、膠芽腫幹細胞を標的とした新規治療薬の開発のための有用な標的である可能性を示唆している。



**Figure 30. Stat5b function downstream of Lgr5 in glioblastoma stem cells.**

## 総括

極めて難治性である膠芽腫は、高い浸潤性と脳という発生部位の特殊性から完全に摘出することは極めて困難である。また、残存する腫瘍組織に対して放射線療法と化学療法が実施されるが、これらに抵抗性を示す膠芽腫幹細胞の存在が、膠芽腫の治療をさらに困難にする。したがって、膠芽腫幹細胞の生存および増殖に関わるメカニズムの解明と Stat5b の新規治療標的としての有効性について検証することを、本研究を通しての目的とした。

まず第 1 章では、膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現制御機構を明らかにした。膠芽腫組織中で Stat5b の発現は、Hif2 $\alpha$  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 が発現する領域と一致することをみいだした。膠芽腫幹細胞の低酸素条件下での培養により、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。また、RNA 干渉法および Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路阻害剤を用いた検討により、膠芽腫幹細胞において、Stat5b の発現は、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路にも制御されることを明らかにした。すなわち、Stat5b の発現は、低酸素応答シグナルにより Lgr5 とともに促進的に制御されており、さらに Wnt/ $\beta$ -Catenin シグナルにも複合的に制御を受けることが示唆された。

次に第 2 章では、Stat5b を標的とした膠芽腫幹細胞への抗腫瘍効果の検討および、マウス膠芽腫モデルに対する Stat5 阻害剤 IQDMA および Stat5b ノックダウンによる増殖抑制効果を検証した。*in vitro* において Stat5b ノックダウンおよび IQDMA 処理により膠芽腫幹細胞の増殖が抑制され、DNA 合成期細胞の減少とアポトーシスの誘導を確認した。マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析により、Stat5b 下流遺伝子として Cyclin E2 遺伝子を同定した。IQDMA はアストロサイトに対し Caspase 3/7 の活性化で評価されるアポトーシス誘導を示さず、*in vivo* においても体重減少を起こすことなく有意な腫瘍抑制効果を示した。さらに、*in vivo* での Stat5b ノックダウンは腫瘍形成を抑制し、生存期間を有意に延長した。

本研究成果は、膠芽腫における Stat5b の発現制御機構を明らかにし、膠芽腫幹細胞に対する Stat5b 阻害による抗腫瘍効果とそのメカニズムの一端を明らかにし、膠芽腫の治療耐性に関与する膠芽腫幹細胞を標的とした新規治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

## 謝辞

研究を遂行し本稿をまとめるに当たり、御懇篤なる御指導を賜りました京都薬科大学臨床腫瘍学分野 中田 晋 准教授に厚く御礼申し上げます。実験技術や論文作成をはじめとした、あらゆるスキルを基礎から細部にわたって御指導、御鞭撻を頂戴いたしましたこと、感謝の念に堪えません。

また、本論文の査読ならびに御指導、御高閲を賜りました本学 薬物治療学分野 加藤伸一 教授ならびに統合薬科学分野 高田 和幸 教授に篤く御礼申し上げます。

さらに、博士課程進学以前より現在に至るまで、懇切丁寧なる研究の御指導を頂戴し、円滑な研究室運営を賜りました臨床腫瘍学分野 飯居 宏美 助教に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行に御尽力頂きました京都府立医科大学大学院 創薬医学分野 谷口 恵香 助教ならびに本学 臨床腫瘍学分野 大学院生 安藤 翔太 学士、野瀬 梢 学士に感謝の意を表します。

また、幅広い勉強の機会を賜りました、本学制度とがんプロフェッショナル養成基盤推進プラン制度に心より御礼申し上げます。

本学 臨床腫瘍学分野 前教授の故 吉貴 達寛 先生には、博士課程進学以前より様々な研究の御助言を頂戴し、長きにわたり温かく見守って下さいましたこと、深く敬意と感謝の意を表します。

そして、実験に協力して頂きました岡本 仁志 氏をはじめとした臨床腫瘍学分野の学部学生の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、大学院生活を送るに当たり、様々な面で支えて頂いたすべての皆様に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; 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.* **2005**, 352, 987-96.
- 2) Marenco-Hillebrand L, Wijesekera O, Suarez-Meade P, Mampre D, Jackson C, Peterson J, Trifiletti D, Hammack J, Ortiz K, Lesser E, Spiegel M, Prevatt C, Hawayek M, Quinones-Hinojosa A, Chaichana KL. Trends in glioblastoma: outcomes over time and type of intervention: a systematic evidence based analysis. *J. Neurooncol.* **2020**, 147, 297-307.
- 3) Narita Y, Shibui S; Committee of Brain Tumor Registry of Japan Supported by the Japan Neurosurgical Society. Trends and outcomes in the treatment of gliomas based on data during 2001-2004 from the Brain Tumor Registry of Japan. *Neurol. Med. Chir (Tokyo)*. **2015**, 55, 286-95.
- 4) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. **2001**, 414, 105-11.
- 5) Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. **2011**, 469, 314-22.
- 6) Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **2003**, 100, 15178-83.
- 7) 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, 5821-8.
- 8) Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. **2004**, 432, 396-401.

- 9) Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* **2015**, 29, 1203-17.
- 10) Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN. Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol. Aspects. Med.* **2014**, 39, 82-101.
- 11) Laks DR, Visnyei K, Kornblum HI. Brain tumor stem cells as therapeutic targets in models of glioma. *Yonsei Med. J.* **2010**, 51, 633-40.
- 12) Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* **2004**, 64, 7011-21.
- 13) Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature.* **2012**, 488, 522-6.
- 14) Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* **2006**, 444, 756-60.
- 15) Auffinger B, Spencer D, Pytel P, Ahmed AU, Lesniak MS. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Rev. Neurother.* **2015**, 15, 741-52.
- 16) Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* **2010**, 7, 150-61.
- 17) Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell.* **2009**, 15, 501-13.
- 18) Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze AT, Nistér M, Reifenberger G, Lundeberg J, Frisén J, Acker T. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain.* **2010**, 133, 983-95.



- 19) Renfrow JJ, Soike MH, Debinski W, Ramkissoon SH, Mott RT, Frenkel MB, Sarkaria JN, Lesser GJ, Strowd RE. Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ : a novel target in gliomas. *Future Med. Chem.* **2018**, 10, 2227-36.
- 20) Chinot OL, de La Motte Rouge T, Moore N, Zeaiter A, Das A, Phillips H, Modrusan Z, Cloughesy T. AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv. Ther.* **2011**, 28, 334-40.
- 21) Boyd NH, Tran AN, Bernstock JD, Etminan T, Jones AB, Gillespie GY, Friedman GK, Hjelmeland AB. Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment. *Theranostics.* **2021**, 11, 665-83.
- 22) de Lau W, Peng WC, Gros P, Clevers H. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* **2014**, 28, 305-16.
- 23) Nakata S, Phillips E, Goidts V. Emerging role for leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4 in cancer stem cells. *Cancer Manag. Res.* **2014**, 6, 171-80.
- 24) Leung C, Tan SH, Barker N. Recent Advances in Lgr5+ Stem Cell Research. *Trends. Cell Biol.* **2018**, 28, 380-91.
- 25) Nakata S, Campos B, Bageritz J, Bermejo JL, Becker N, Engel F, Acker T, Momma S, Herold-Mende C, Lichter P, Radlwimmer B, Goidts V. LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain Pathol.* **2013**, 23, 60-72.
- 26) Zhang J, Cai H, Sun L, Zhan P, Chen M, Zhang F, Ran Y, Wan J. LGR5, a novel functional glioma stem cell marker, promotes EMT by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and predicts poor survival of glioma patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, 37, 225.
- 27) Hiraoka K, Hayashi T, Kaneko R, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, Kawasaki Y, Akiyama T. SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for glioblastoma tumorigenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, 460, 216-21.

- 28) Tanigawa S, Fujita M, Moyama C, Ando S, Ii H, Kojima Y, Fujishita T, Aoki M, Takeuchi H, Yamanaka T, Takahashi Y, Hashimoto N, Nakata S. Inhibition of Gli2 suppresses tumorigenicity in glioblastoma stem cells derived from a de novo murine brain cancer model. *Cancer Gene Ther.* **2021**, 10, 1038/s41417-020-00282-5.
- 29) Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1995**, 92, 8831-5.
- 30) Tormo AJ, Letellier MC, Sharma M, Elson G, Crabé S, Gauchat JF. IL-6 activates STAT5 in T cells. *Cytokine.* **2012**, 60, 575-82.
- 31) Cao S, Yan Y, Zhang X, Zhang K, Liu C, Zhao G, Han J, Dong Q, Shen B, Wu A, Cui J. EGF stimulates cyclooxygenase-2 expression through the STAT5 signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Int. J. Oncol.* **2011**, 39, 383-91.
- 32) Carter-Su C, Schwartz J, Argetsinger LS. Growth hormone signaling pathways. *Growth Horm. IGF Res.* **2016**, 28, 11-5.
- 33) Loh CY, Arya A, Naema AF, Wong WF, Sethi G, Looi CY. Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication. *Front. Oncol.* **2019**, 9, 48.
- 34) Nicolas CS, Amici M, Bortolotto ZA, Doherty A, Csaba Z, Fafouri A, Dournaud P, Gressens P, Collingridge GL, Peineau S. The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAKSTAT.* **2013**, 2, e22925.
- 35) O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N. Engl. J. Med.* **2013**, 368, 161-70.
- 36) Kollmann S, Grundschober E, Maurer B, Warsch W, Grausenburger R, Edlinger L, Huuhtanen J, Lagger S, Hennighausen L, Valent P, Decker T, Strobl B, Mueller M, Mustjoki S, Hoelbl-Kovacic A, Sexl V. Twins with different personalities: STAT5B-but not STAT5A-has a key role in BCR/ABL-induced leukemia. *Leukemia.* **2019**, 33, 1583-97.

- 37) Rajala HL, Eldfors S, Kuusanmäki H, van Adrichem AJ, Olson T, Lagström S, Andersson EI, Jerez A, Clemente MJ, Yan Y, Zhang D, Awwad A, Ellonen P, Kallioniemi O, Wennerberg K, Porkka K, Maciejewski JP, Loughran TP Jr, Heckman C, Mustjoki S. Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood*. **2013**, 121, 4541-50.
- 38) Tu Y, Zhong Y, Fu J, Cao Y, Fu G, Tian X, Wang B. Activation of JAK/STAT signal pathway predicts poor prognosis of patients with gliomas. *Med. Oncol.* **2011**, 28, 15-23.
- 39) Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, Thokala R, Sheikh S, Saxena D, Prokop S, Liu DA, Qian X, Petrov D, Lucas T, Chen HI, Dorsey JF, Christian KM, Binder ZA, Nasrallah M, Brem S, O'Rourke DM, Ming GL, Song H. Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*. **2020**, 180, 188-204, e22.
- 40) Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. **2008**, 455, 1061-68.
- 41) Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhi R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L; TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. **2013**, 155, 462-77.
- 42) Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancey JE, McLendon RE, Kao JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Uhlig SE, Herndon JE 2nd, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2004**, 22, 133-42.
- 43) Brown PD, Krishnan S, Sarkaria JN, Wu W, Jaeckle KA, Uhm JH, Geoffroy FJ, Arusell R, Kitange G, Jenkins RB, Kugler JW, Morton RF, Rowland KM Jr, Mischel P, Yong WH,

- Scheithauer BW, Schiff D, Giannini C, Buckner JC; North Central Cancer Treatment Group Study N0177. Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5603-9.
- 44) Zadeh G, Bhat KP, Aldape K. EGFR and EGFRvIII in glioblastoma: partners in crime. *Cancer Cell.* **2013**, 24, 403-4.
  - 45) Fan QW, Cheng CK, Gustafson WC, Charron E, Zipper P, Wong RA, Chen J, Lau J, Knobbe-Thomsen C, Weller M, Jura N, Reifemberger G, Shokat KM, Weiss WA. EGFR phosphorylates tumor-derived EGFRvIII driving STAT3/5 and progression in glioblastoma. *Cancer Cell.* **2013**, 24, 438-49.
  - 46) Wiesner SM, Decker SA, Larson JD, Ericson K, Forster C, Gallardo JL, Long C, Demorest ZL, Zamora EA, Low WC, SantaCruz K, Largaespada DA, Ohlfest JR. De novo induction of genetically engineered brain tumors in mice using plasmid DNA. *Cancer Res.* **2009**, 69, 431-39.
  - 47) Fujita M, Scheurer ME, Decker SA, McDonald HA, Kohanbash G, Kasthuber ER, Kato H, Bondy ML, Ohlfest JR, Okada H. Role of type 1 IFNs in antglioma immunosurveillance- using mouse studies to guide examination of novel prognostic markers in humans. *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16, 3409-19.
  - 48) Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* **1992**, 255, 1707-10.
  - 49) Rashid M, Zadeh LR, Baradaran B, Molavi O, Ghesmati Z, Sabzichi M, Ramezani F. Up-down regulation of HIF-1 $\alpha$  in cancer progression. *Gene.* **2021**, 798, 145796.
  - 50) Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell.* **2013**, 155, 750-64.
  - 51) Mu J, Hui T, Shao B, Li L, Du Z, Lu L, Ye L, Li S, Li Q, Xiao Q, Qiu Z, Zhang Y, Fan J, Ren G, Tao Q, Xiang T. Dickkopf-related protein 2 induces G0/G1 arrest and apoptosis through suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and is frequently methylated in breast cancer. *Oncotarget.* **2017**, 8, 39443-59.

- 52) Nusblat LM, Tanna S, Roth CM. Gene silencing of HIF-2 $\alpha$  disrupts glioblastoma stem cell phenotype. *Cancer Drug Resist.* **2020**, 3, 199-208.
- 53) Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, Moon RT, Teo JL, Kim HY, Moon SH, Ha JR, Kahn M. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2004**, 101, 12682-7.
- 54) Parry PV, Engh JA. Knockdown of LGR5 suppresses the proliferation of glioma cells in vitro and in vivo. *Neurosurgery.* **2014**, 74, N14-5.
- 55) Wang D, Zhou J, Fan C, Jiao F, Liu B, Sun P, Miao J, Zhang Q. Knockdown of LGR5 suppresses the proliferation of glioma cells in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **2014**, 31, 41-9.
- 56) Chen YH, McGowan LD, Cimino PJ, Dahiya S, Leonard JR, Lee DY, Gutmann DH. Mouse low-grade gliomas contain cancer stem cells with unique molecular and functional properties. *Cell Rep.* **2015**, 10, 1899-912.
- 57) Xie Y, Sundström A, Maturi NP, Tan EJ, Marinescu VD, Jarvius M, Tirfing M, Jin C, Chen L, Essand M, Swartling FJ, Nelander S, Jiang Y, Uhrbom L. LGR5 promotes tumorigenicity and invasion of glioblastoma stem-like cells and is a potential therapeutic target for a subset of glioblastoma patients. *J. Pathol.* **2019**, 247, 228-40.
- 58) Dudley AC, Thomas D, Best J, Jenkins A. A VEGF/JAK2/STAT5 axis may partially mediate endothelial cell tolerance to hypoxia. *Biochem. J.* **2005**, 390, 427-36.
- 59) Manickam M, Tulsawani R. Survival response of hippocampal neurons under low oxygen conditions induced by *Hippophae rhamnoides* is associated with JAK/STAT signaling. *PLoS One.* **2014**, 9, e87694.
- 60) Ullmann P, Nurmik M, Schmitz M, Rodriguez F, Weiler J, Qureshi-Baig K, Felten P, Nazarov PV, Nicot N, Zuegel N, Haan S, Letellier E. Tumor suppressor miR-215 counteracts hypoxia-induced colon cancer stem cell activity. *Cancer Lett.* **2019**, 450, 32-41.

- 61) Ishii A, Kimura T, Sadahiro H, Kawano H, Takubo K, Suzuki M, Ikeda E. Histological Characterization of the Tumorigenic "Peri-Necrotic Niche" Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. *PLoS One*. **2016**, 11, e0147366.
- 62) Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, LaManna JC, Chavez JC, Klein PS, Simon MC. O2 regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nat. Cell Biol.* **2010**, 12, 1007-13.
- 63) Goidts V, Bageritz J, Puccio L, Nakata S, Zapatka M, Barbus S, Toedt G, Campos B, Korshunov A, Momma S, Van Schaftingen E, Reifenberger G, Herold-Mende C, Lichter P, Radlwimmer B. RNAi screening in glioma stem-like cells identifies PFKFB4 as a key molecule important for cancer cell survival. *Oncogene*. **2012**, 31, 3235-43.
- 64) Bao S, Wu Q, Li Z, Sathornsumetee S, Wang H, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res.* **2008**, 68, 6043-8.
- 65) Liu W, Xing F, Iizumi-Gairani M, Okuda H, Watabe M, Pai SK, Pandey PR, Hirota S, Kobayashi A, Mo YY, Fukuda K, Li Y, Watabe K. N-myc downstream regulated gene 1 modulates Wnt- $\beta$ -catenin signalling and pleiotropically suppresses metastasis. *EMBO Mol. Med.* **2012**, 4, 93-108.
- 66) Liang QC, Xiong H, Zhao ZW, Jia D, Li WX, Qin HZ, Deng JP, Gao L, Zhang H, Gao GD. Inhibition of transcription factor STAT5b suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* **2009**, 273, 164-71.
- 67) Dubois N, Berendsen S, Tan K, Schoysmans L, Spliet W, Seute T, Bours V, Robe PA. STAT5b is a marker of poor prognosis, rather than a therapeutic target in glioblastomas. *Int. J. Oncol.* **2022**, 61, 124.
- 68) Chien CM, Yang SH, Lin KL, Chen YL, Chang LS, Lin SR. Novel indoloquinoline derivative, IQDMA, suppresses STAT5 phosphorylation and induces apoptosis in HL-60 cells. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, 176, 40-7.

- 69) Yang SH, Chien CM, Su JC, Chen YL, Chang LS, Lin SR. Novel indoloquinoline derivative, IQDMA, inhibits STAT5 signaling associated with apoptosis in K562 cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2008**, 22, 396-404.
- 70) Kelder T, van Iersel MP, Hanspers K, Kutmon M, Conklin BR, Evelo CT, Pico AR. WikiPathways: building research communities on biological pathways. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, D1301–7.
- 71) Liang QC, Xiong H, Zhao ZW, Jia D, Li WX, Qin HZ, Deng JP, Gao L, Zhang H, Gao GD. Inhibition of transcription factor STAT5b suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* **2009**, 273, 164-71.
- 72) Moyama C, Fujita M, Okamoto H, Ii H, Nakata S. Myb Repression Mediates Stat5b-Knockdown-Induced Apoptosis and Inhibits Proliferation of Glioblastoma Stem Cells. *Cancer Genomics Proteomics.* **2023**, 20, 195-202.
- 73) Zhou F, Zhang L, van Laar T, van Dam H, Ten Dijke P. GSK3 $\beta$  inactivation induces apoptosis of leukemia cells by repressing the function of c-Myb. *Mol. Biol. Cell.* **2011**, 22, 3533-40.
- 74) Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells.* **1999**, 17, 138-46.
- 75) Maurer B, Kollmann S, Pickem J, Hoelbl-Kovacic A, Sexl V. STAT5A and STAT5B-Twins with Different Personalities in Hematopoiesis and Leukemia. *Cancers (Basel).* **2019**, 11, 1726.
- 76) Furth PA, Nakles RE, Millman S, Diaz-Cruz ES, Cabrera MC. Signal transducer and activator of transcription 5 as a key signaling pathway in normal mammary gland developmental biology and breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2011**, 13, 220.