

氏名 (生年月日) <sup>たか</sup> <sup>だ</sup> <sup>てつ</sup> <sup>や</sup>  
高 田 哲 也 (1987年11月4日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博 第158号

学位授与の日付 2016年3月19日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 神経膠芽腫幹細胞を標的とした新規治療分子としてのイオン輸送関連分子の可能性

論文審査委員 (主査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 吉貴 達寛

(副査) 教授 大矢 進

## 論文内容の要旨

近年、がんが幹細胞能力とがん形成能をあわせ持つ少数のがん幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) により形成・維持され、遠隔転移やがん治療後の再発に関与していることが明らかとなり、CSC の性状、動態の把握、および CSC を標的とした治療開発は、がん克服のための最重要課題である。神経膠芽腫 (Glioblastoma: GBM) は神経膠腫の中で最も悪性度が高い疾患である。腫瘍組織内には正常な組織と腫瘍組織が混在しているため、治療は放射線療法と化学療法の併用が標準治療として行われている。しかし再発率が高く、5年生存率も10%ととても予後が悪い疾患の一つである。このGBMにもCSC集団が存在し、これらが予後不良に関与していると考えられている。がん細胞の代謝の特徴は、好気的環境下においても解糖系が活性化されており、細胞質内では解糖系の最終産物である乳酸等の多くの酸性物質が産生され、細胞質内にプロトン ( $H^+$ ) が蓄積される。このままでは細胞質内の pH が低下するが、がん細胞は  $H^+$  などを細胞外へ排出、または酸性顆粒内にため込む機構を備えている。それがイオン輸送体や酵素といった pH 調節に働くイオン輸送関連分子であり、がん細胞の生存に欠かせない分子である。よって、CSC においてもこれらが幹細胞の生存と強く関係していることが予想される。そこで私は CSC の  $H^+$  環境を調節するイオン輸送関連分子の発現および機能阻害を、GBM 細胞株を用いて検討した。

### 1. イオン輸送関連分子の発現量解析

本実験では GBM 細胞株の U-251 MG および U-87 MG を用いて quantitative RT-PCR (qRT-PCR) によってイオン輸送関連分子の発現量変化を解析した。GBM 細胞株における CSCs (GSCs) は sphere 形成法を用いて作製した。作製した sphere は幹細胞マーカー (Nestin, Nanog, CD133, Sox-2, Oct-4) の発現が上昇していたことが qRT-PCR および蛍光免疫染色によって確認された。このとき sphere が低酸素環境になっていることがピモニダゾールの蓄積によって明らかとなった。そしてそれらの細胞を通常酸素濃度条件 (20%  $O_2$ ) 下と低酸素濃度条件 (1%  $O_2$ : hypoxia) 下で培養した。イオン輸送関連分子としては炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase: CA)、 $Na^+$ - $H^+$  交換輸送体 ( $Na^+$ - $H^+$  exchanger: NHE)、乳酸輸送担体 (monocarboxylate transporter: MCT) について解析を行った。CA9 や CA12 は低酸素適応 (hypoxia adapted: HA) 細胞や CSC にしたときに上昇した。とくに CA12 は CSCs にすることで HA 細胞と比べてより上昇した。NHE は、U-251 MG では NHE1, NHE2 ともに HA 細胞や CSCs で低下した。U-87 MG

では、NHE2がCSCsで上昇した。MCT4はU-251 MGではHA細胞、U-87 MGではHA細胞やCSCsで上昇した。MCT1はCSCsで上昇した。また、CSCsにて発現が上昇していたCAやMCTの発現をastrocytesにおいて検討したところ、non-CSCsと比べて低かった。以上の結果より、CA12とMCT1はGSCに対する新規治療ターゲットとして有用なイオン輸送関連分子である可能性が示唆された。

## 2. MCT阻害剤の細胞増殖阻害の解析

第一章の結果より、MCT1はCSCにすることでのみ発現量が上昇したことから、MCT阻害剤であるpHMBSのU-251 MGやU-87 MGのnon-CSCsやCSCsに対する細胞増殖抑制の評価を行った。その結果、pHMBSはすべてのGBM細胞において細胞増殖抑制効果を示した。また同時にsphere形成の阻害や細胞内への乳酸貯留を引き起こした。しかし、正常の神経膠細胞であるヒトアストロサイト(astrocytes)に対して、CSCsより低濃度で細胞増殖阻害効果を示したことから非選択的なMCT阻害は正常細胞に与える影響が大きいことが示唆された。次にMCT1を阻害するMCT1選択的阻害剤であるAR-C117977を用いて同様の評価を行った。その結果、pHMBSと同様にAR-C117977はすべてのGBM細胞において細胞増殖抑制効果を示した。また、sphere形成の阻害や細胞内への乳酸の貯留も引き起こした。astrocytesに対しては、細胞増殖抑制効果は示すもののCSCsより高濃度を必要とした。以上の結果より、MCT1を選択的に阻害することは正常な神経膠細胞には低毒性で、GSCに対する治療標的分子として期待できる。

## 3. CA阻害剤の細胞増殖阻害解析

第一章の結果より、CA9のCSCsにおける発現上昇はsphere内が低酸素環境になっていたことが要因であると示唆された。しかしCA12はCSCsにすることでHA細胞と比べ発現量が上昇したことから、CA阻害剤であるU104のU-251 MGやU-87 MGのnon-CSCsやCSCsに対する細胞増殖抑制の評価を行った。その結果、U104はすべてのGBM細胞において細胞増殖抑制効果を示した。また同時にsphere形成の阻害も引き起こした。しかし、astrocyteに対してU104は今回用いた濃度域では影響を及ぼさなかった。以上の結果より、CAを阻害することは正常な神経膠細胞には無毒性で、GSCに対する治療標的分子として期待できる。

臨床におけるがんの治療において、再発の原因と考えられるがん幹細胞の増殖を抑制できることは、がんの根治治療に繋がることを期待できる。

本研究によりGBMにおいてCSCは、イオン輸送関連分子であるMCT1やCA12の発現量を増加させることで幹細胞の維持を行っていることが示唆された。また、MCT1選択的阻害剤であるAR-C117977は、MCT1を阻害することで乳酸を細胞内に貯留させ、恒常性を維持できなくさせGSCsを細胞増殖抑制へと導いた。特にMCT1の発現量が高いGBM細胞ほど抑制効果が高い可能性が示唆された。一方、CA阻害剤であるU104は、CA12などを阻害することで、同様に恒常性を維持できなくさせ、GSCsを細胞増殖抑制へと導いた。特にCA12の発現量が高いGBM細胞ほど効果が高い可能性が示唆された。しかしastrocyteには影響を及ぼさなかった。このようにCSCで高発現しているイオン輸送関連分子を阻害することは、CSCの恒常性の維持を破綻させ、細胞増殖抑制へと導くことが明らかとなった。

以上のように、本研究はGSCを標的とした新規治療分子としてのイオン輸送関連分子の可能性を示唆し、副作用の少ない新規抗がん剤の開発に寄与できるものと期待する。

## 審査の結果の要旨

近年、がんが幹細胞能力とがん形成能をあわせ持つ少数のがん幹細胞 (CSC) により形成・維持され、遠隔転移やがん治療後の再発に関与することが明らかとなった。CSC を標的とした治療開発は、がん克服のための最重要課題である。神経膠芽腫 (GBM) は神経膠腫の中で最も悪性度が高く、予後が悪い疾患である。この GBM にも CSC 集団 (GSCs) が存在し、予後不良に関与すると報告されている。がん細胞の代謝の特徴は、好氣的環境下においても解糖系が活性化し、細胞質内では解糖系の最終産物である乳酸等の多くの酸性物質が産生され、細胞質内に  $H^+$  が蓄積される。このままでは細胞質内の pH が低下するが、がん細胞は細胞外へ排出、または酸性顆粒内にため込む機構を備えている。その機構がイオン輸送関連分子であり、がん細胞の生存に欠かせない因子である。よって、CSC においてもイオン輸送関連分子が幹細胞の生存と強く関係していることが予想される。そこで私は CSC におけるイオン輸送関連分子の発現および機能阻害を、GBM 細胞株を用いて検討した。

GBM 細胞株の U-251 MG および U-87 MG を用いて qRT-PCR によってイオン輸送関連分子の発現量変化を解析した。CSCs は sphere 形成法を用いて作製した。作製した spheres は複数の幹細胞マーカーの発現が上昇していたことが qRT-PCR および蛍光免疫染色によって確認された。また sphere が低酸素環境にあることがピモニダゾールの蓄積によって明らかとなった。イオン輸送関連分子としては炭酸脱水酵素 (CA)、 $Na^+H^+$  交換輸送体 (NHE)、乳酸輸送担体 (MCT) について調べた。その結果、CSC にすることで CA9 や CA12 や MCT1 が上昇したことから、幹細胞維持のためには、これらの分子が重要な役割を担っていることが推定される。

MCT 阻害剤である pHMBS の細胞増殖阻害の評価を行った。その結果、すべての細胞において細胞増殖阻害効果が見られ、同時に sphere 形成阻害や細胞内乳酸貯留を引き起こすことが明らかとなった。しかし、正常の神経膠細胞である astrocytes に対して CSCs より低濃度で細胞増殖阻害を示したことから非選択的な MCT 阻害は正常な細胞に与える影響が大きいことが示された。次に MCT1 選択的阻害剤である AR-C117977 を用いて同様の評価を行った。その結果、pHMBS と同様にすべての細胞において細胞増殖阻害効果が見られた。また、sphere 形成阻害や細胞内乳酸貯留も引き起こされた。また、astrocytes に対しても細胞増殖阻害は示すものの、CSC より高濃度を必要とした。以上の結果から MCT1 選択的阻害は GSCs に対して高い細胞増殖阻害を示すことが明らかとなった。

CA 阻害剤である U104 の細胞増殖阻害の評価を行った。その結果、すべての細胞において細胞増殖阻害が見られた。また同時に sphere 形成阻害も引き起こした。一方、astrocytes には影響を及ぼさなかった。以上の結果から CA 阻害剤は GSCs に対して高い細胞増殖阻害を示すことが明らかとなった。

本研究により CSC で高発現しているイオン輸送関連分子を阻害することは、CSC の恒常性の維持を破綻させ、細胞増殖抑制へと導くことが明らかとなった。臨床におけるがんの治療において、再発の原因と考えられるがん幹細胞の増殖を抑制できることは、がんの根治治療に繋がることを期待できる。以上の結果より、本研究はイオン輸送関連分子を標的とした新規治療薬の開拓に寄与できるものであると期待する。

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