

平成28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名：(日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名：(日本語) グリオーマ幹細胞の代謝特性を標的とした新しい治療法の開発  
(英語) Development of a new treatment targeting glioma stem cell metabolism

研究開発担当者 (日本語) 学校法人慶應義塾  
慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門 特任助教  
サンペトラ オルテア

所属 役職 氏名：(英語) Keio University School of Medicine, Institute for Advanced Medical Research,  
Division of Gene Regulation, Project Instructor, Oltea Sampetean

実施期間：平成28年9月1日～平成29年3月31日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

膠芽腫が難治性である主な理由は現行の治療に抵抗性を持つグリオーマ幹細胞の存在にあると考えられている。グリオーマ幹細胞の発見から10年以上たった現在でも、その集団を根絶させる治療法が開発されていない。近年、遺伝子発現及び機能解析より、グリオーマ幹細胞の多様性、不均一性、可塑性が治療法を構築する上で重要な問題点として浮かび上がってきた。本研究はグリオーマ幹細胞の代謝プロファイルの分子基盤を解明することにより、悪性脳腫瘍の生物学的理解を深め、また、その代謝特性を標的とした新しい治療法を開発することを目指している。

本年度では以下の二つの開発項目を中心に解析を行った。

(1) グリオーマ幹細胞がエネルギー、バイオマスの産出に利用しうる代謝経路及び基質の同定。

確立しているマウス誘導型グリオーマ幹細胞の解析系を用いて、まずシングル・セ

ル・クローニングにて複数のグリオーマ幹細胞のクローン集団を樹立した。クローンの代謝表現型を解析した結果、定常状態のグリオーマ幹細胞においては解糖系利用型、酸化的リン酸化/ミトコンドリア利用型以外のプロファイルは確認されず、多くのグリオーマ幹細胞がその中間のプロファイルを呈することが明らかになった。次に、それぞれの代謝プロファイルに対する抗がん剤、代謝阻害剤の効果を評価した。その結果、解糖系利用型グリオーマ幹細胞には2デオキシグルコースなどの代表的な解糖系阻害剤が著効するのに対し、酸化的リン酸化利用型のグリオーマ幹細胞は既存の抗がん剤のみならず、メトフォルミンなどの代謝阻害剤の投与でも死滅しないことを見出した。以上の結果から、二つの表現型の中では、酸化的リン酸化利用型のグリオーマ幹細胞が新規治療の真の標的であることが示唆された。

## (2) 代謝可塑性の実態の解明及びその制御分子の同定。

酸化的リン酸化利用型グリオーマ幹細胞がメトフォルミン投与によって一時的に代謝表現型を解糖系利用型に変えることに注目して解析を進めた。酸素が利用できない状態で引き起こされる代謝可塑性にはその誘導因子に関係なく、急性期に起きる変化と慢性期に起きる変化が含まれることも明らかにした。培養脳切片の評価系を用いて、その現象が培養中のグリオーマ幹細胞のみならず、酸化的リン酸化阻害剤で処理した腫瘍の内部でも起きていることを証明した。また、連続移植を行い、この代謝変化が可逆的であり、繰り返し引き起こされることを見出した。代謝可塑性の制御因子を同定するために、酸化的リン酸化利用型グリオーマ幹細胞が低酸素曝露によって解糖系利用型に転換したときの代謝産物を解析し、可塑性にはグルタミンが関連していることを見出した。また、公開データベースに登録されているグリオーマにおける遺伝子発現、タンパク発現の解析と合わせて、グルタミン代謝関連酵素の中で阻害候補となる酵素を同定した。

上記の結果から、代謝可塑性の克服が酸化的リン酸化利用型グリオーマ幹細胞の撲滅に不可欠であると示唆され、引き続き制御因子の解析を推進する。

One of the main reasons glioblastoma has no curative options has been traced to the existence of a subset of highly treatment-refractory cells, the glioma stem cells (GSCs). Although more than 10 years have passed since the discovery of GSCs, there is still no treatment able to completely eradicate them. Recently, genetic and functional studies have shown that for GSCs, diversity, heterogeneity, and plasticity are the main issues that need to be considered when developing specific therapeutic strategies. This research aims to elucidate the molecular basis of the metabolic profiles of GSCs, further our understanding of the biology of malignant brain tumors, and develop a new glioblastoma treatment based on metabolic targeting of its stem cells. This year, analysis was performed as follows:

(1) Analysis and identification of the metabolic profiles and substrates used by glioma stem cells: Using our model of induced murine glioma stem cells,

we first established several clonal populations of GSCs by single cell cloning. We then analyzed the metabolic phenotypes of these populations. We found that under homeostatic conditions glioma stem cells can assume a glycolytic or an oxidative phosphorylation/ mitochondrial phenotype, but mostly a combination of both. No other phenotypes have been confirmed at this time. Next, we investigated the response of stem cells of each phenotype to chemotherapeutic agents and metabolic inhibitors. We found that while glycolysis inhibitors such as 2-deoxyglucose were effective for the glycolytic GSCs, the mitochondrial populations could not be completely exterminated by either cytotoxic drugs or existing inhibitors of oxidative phosphorylation. These results suggested that the mitochondrial subpopulation is the more therapy-resistant of the two types and the true target of future metabolic treatments.

(2) Analysis of metabolic plasticity and its main regulators: We focused on the fact that mitochondrial-type GSCs exhibited a temporary upregulation of glycolysis after treatment with metformin. We found that when oxygen use is restricted, independent of the cause, mitochondrial-type GSCs show metabolic plasticity, and that this plasticity occurs by different mechanisms during the acute phase and the chronic phase. The metabolic plasticity was proven not only for cultured GSCs, but also in organotypic brain explants and in GSCs from serial transplantations. We also found that the metabolic adaptation to hypoxia was reversible. By comparing the metabolic parameters of mitochondrial-type GSCs during normoxia and hypoxia we showed that glutamine is important in this type of plasticity. Furthermore, by combining our data with the analysis of gene and protein expression in human glioma samples from public databases, we identified targeting candidates among glutamine-metabolism related enzymes. The above findings suggest that overcoming metabolic plasticity is imperative when targeting GSCs and we are therefore continuing the analysis of its determining factors.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. がん幹細胞の代謝不均一性及び可塑性について、口頭、サンペトラ・オルテア、柴尾俊輔、南徳明、佐谷秀行、第 75 回日本癌学会学術総会、2016/10/6、国内。
2. 脳腫瘍幹細胞における低酸素応答性、代謝不均一性と治療抵抗性について、口頭、サンペトラ・オルテア、第 14 回がんとハイポキシア研究会、2016/11/5、国内

3. Glioma stem cells: heterogeneity patterns and therapeutic challenges について、口頭、Sampetean O, 2nd Asian Central Nervous System Germ Cell Tumor Conference, 2016/12/18, 海外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし