

脂肪酸合成酵素（FASN）は、グリオーマ幹細胞の
未分化能維持に関与する

氏名 安本 有希

所属 山口大学大学院医学系研究科
システム統御医学系専攻
器官解剖学分野

平成 28 年 1 月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	4
4. 方法	
4-1. グリオブラストーマ標本	5
4-2. 患者由来グリオーマ幹細胞株の樹立	5
4-3. <i>De novo</i> 脂質合成アッセイ	6
4-4. 定量リアルタイム PCR 法	6
4-5. 免疫不全マウス (NOD-SCID mouse) への移植実験と解析	7
4-6. 免疫染色	8
4-7. ウェスタンブロット法	9
4-8. 細胞生存性試験	10
4-9. 浸潤アッセイ	10
4-10. スフィアアッセイ	11
4-11. 統計処理	11
5. 結果	
5-1. GSCs における <i>de novo</i> 脂肪酸合成の亢進	12
5-2. GSCs における脂肪酸合成酵素 (FASN) の発現	13
5-3. FASN の阻害による GSCs 浸潤能の低下	16
5-4. FASN の阻害による GSCs のスフィア形成能の低下	18
5-5. FASN の阻害による GSCs の未分化マーカーの発現低下	19
6. 考察	21
7. 結語	24

8. 謝辭	25
9. 參考文獻	26

1. 要旨

最近の研究からは、癌における代謝のリプログラミングをもたらす Warberg 効果と、それに続く *de novo* 脂肪酸合成が、癌幹細胞代謝の特徴である可能性が示唆され、癌における脂質代謝のリプログラミングが、癌の生物学的特性を理解するうえで、大きな注目を集めている。グリオブラストーマはグリオーマの中で最も予後が悪く、その抗癌剤・放射線療法への耐性や再発にはグリオーマ幹細胞が関与していると考えられているが、グリオーマ幹細胞における脂質代謝の関与については未だ不明である。脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase : FASN) は *de novo* 脂肪酸合成に必須の酵素であり、様々な癌において強く発現していることが報告されている。本研究では、患者由来グリオーマ幹細胞 (GSCs) における FASN の発現とその生物学的意義について解析した。グリオブラストーマ患者から樹立した GSCs は、血清添加により分化誘導を行った株と比較したところ、*de novo* 脂質合成が亢進していた。また、GSCs において FASN の強い発現が認められた。一方、GSCs に対して血清添加による分化誘導を行ったところ、nestin、Sox2、脂肪酸結合タンパク質 (Fatty acid binding protein : FABP) 7 などの幹細胞マーカーの発現低下とともに、FASN の発現が低下した。一方、分化マーカーである GFAP (glial fibrillary acidic protein) の発現上昇が認められた。さらに、FASN 阻害剤 (cerulenin) の添加により *de novo* 脂肪酸合成を阻害すると、GSCs の浸潤能が低下した。以上の結果から、FASN はグリオーマ幹細胞の脂肪酸代謝および *de novo* 脂肪酸合成を介して、GSCs の未分化性維持と浸潤能に関与していることが示唆された。

2. 研究の背景

グリオーマは脳腫瘍の中で最も発症頻度の高い脳腫瘍であり、その中で最も悪性度が高いグリオブラストーマはその生存期間中央値が1~2年と予後が非常に悪い (Stupp et al., 2002)。グリオブラストーマは治療抵抗性の腫瘍であり、その抗癌剤・放射線療法への耐性や再発にはグリオーマ幹細胞が関与していると考えられている (Reya et al., 2001; Ward et al., 2007)。したがって、グリオブラストーマの根治には新規治療法の開発が必要であり、その治療標的の1つとしてのグリオーマ幹細胞に対する生物学的特性の理解が進められている。

近年、癌における代謝のリプログラミングが、癌の生物学的特性として非常に注目されている (Cairns et al., 2011)。グリオブラストーマを含む固形癌は、酸化的リン酸化よりも好氣的解糖経路を利用して ATP を産生していることが知られている (Warburg 効果 : Wolf et al., 2010)。その他の癌細胞の代謝における特徴として、脂肪酸、コレステロール合成系、特に *de novo* 脂肪酸合成系の異常が挙げられる (Menendez et al., 2007)。例えば、Monoacylglycerol lipase (MAGL) は *de novo* 脂肪酸合成系において重要な酵素であり、悪性腫瘍におけるその発現上昇と細胞内 β 酸化の亢進への関与が報告されている (Nomura et al., 2010)。グリオーマに関しては最近、細胞内脂質動態を調節する分子である脂肪酸結合タンパク質 (Fatty acid binding protein : FABP) 7 が、グリオブラストーマのニューロスフェアに高発現していることが報告された (De Rosa et al., 2012)。さらにグリオーマ細胞において FABP7 のノックダウン、過剰発現を行うと増殖、浸潤能がそれぞれ低下、亢進した (Mita et al., 2007; 2010)。しかしながら、グリオーマ細胞における脂肪酸代謝の詳細なメカニズムや、その意義に関しては不明な点が多い。

脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase : FASN) は acetyl-CoA と malonyl-CoA から palmitate への変換を触媒する *de novo* 脂質合成に必須の細胞内酵素である (Wakil et al., 1989)。FASN の発現は病的状況下で発現が上昇し、心血管疾患 (Cabarcas et al., 2010)、2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性 (Menendez et al., 2009)、様々な癌 (Menendez et al., 2007) を含む様々な疾患の発症に関与している。具体的には FASN の発現上昇はグリオーマ (Zhao et al., 2006)、乳癌 (Wang et al., 2001)、前立腺癌 (Swinnen et al., 2002)、大腸癌 (Rashid et al., 1997)、肺癌 (Piyathilake et al., 2000) において報告されている。最近の研究からは、iPS 細胞において FASN の発現が亢進、つまり *de novo* 脂肪酸合成が亢進しており、FASN を薬理的に阻害すると iPS 細胞のリプログラミング能が顕著に抑制されたという報告もある (Vazquez-Martin et al., 2012)。このことから、FASN を介した *de novo* 脂肪酸合成が未分化能維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。さらに、FASN は神経幹細胞や神経前駆細胞においても発現しており、マウスの神経前駆細胞特異的に FASN を欠損させると *adult neurogenesis* が低下することが報告された (Knobloch et al., 2013)。しかしながら、FASN が癌幹細胞の未分化能維持に関与しているかどうかについては、いまだ不明である。

3. 目的

本研究では、グリオーマ幹細胞の特性である浸潤能や未分化能維持に対して *de novo* 脂肪酸合成が関与しているか否かを明らかにすることを目的とした。

具体的には、患者由来グリオーマ幹細胞株（GSCs）を用いて未分化能維持に対する FASN の関与を検討した。まずグリオブラストーマ患者標本、患者由来グリオーマ幹細胞株において FASN の発現を検討した。次に、FASN の薬剤による阻害実験を行い、FASN がグリオーマ幹細胞株の未分化能維持に関与するか否かを検討した。

4. 方法

4-1. 実験内容の承認

ヒトサンプルを用いた研究は、山口大学倫理委員会 (No. H21-49-3) により承認されており、すべての患者から書面でのインフォームドコンセントを得ている。また、本実験はヘルシンキ宣言の原則を遵守して行った。動物実験は、山口大学医学部動物実験施設倫理委員会の承認のもとに行った。

4-2. 患者由来グリオーマ幹細胞株の樹立

GSC 株である G144 と G179 は Dr. Peter Dirks (Arthur and Sonia Labatt Brain Tumor Research Center, Toronto, Canada) に供与していただいた (Pollard et al., 2009)。その他の GSC 株は、グリオブラストーマ手術摘出サンプルから sphere 接着法を用いて樹立した。GSC 株 Y10 (80 歳男性)、Y02 (70 歳女性)、Y04 (63 歳男性)、Y14 (71 歳男性) については、その幹細胞性などの性状等についてすでに報告している (Sadahiro et al., 2014)。以下、GSC 株樹立方法を記載する。まず、グリオブラストーマ患者の外科的に切除された腫瘍を trypsin (1.33 mg/mL)、hyaluronidase (0.67 mg/mL)、kynurenic acid (0.17 mg/mL) に 37°C、50 分間インキュベートし、細胞レベルにまで分散した。それらの細胞は EGF (20 ng/mL) と FGF (20 ng/mL) を含む無血清培地で培養し、neurosphere を形成した。次に accutase を加えて neurosphere を分散させて、1% laminin で 37°C overnight によりコーティングされた dish にまいた。Hormone mix、EGF (20 ng/mL)、FGF (20 ng/mL)、B27 (Carlsbad, CA, USA) を含む無血清培地を 3~4 日おきに半分交換して培養を行った。継代は accutase で細胞を分散させ 1:5 から 1:8 に希釈して播種した。また、分化誘導には Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

に 10%FBS を添加した培地で 9~21 日間培養した。培地と B27 は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から、FBS は HyClone Laboratories, Inc. (Logan, UT, USA) から、それ以外の試薬は Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) から購入した。

4-3. *De novo* 脂質合成アッセイ

De novo 脂質合成は [^{14}C]-glucose (PerkinElmer, Boston, MA, USA) と [^{14}C]-acetate (PerkinElmer) を用いて検討した。細胞をコンフルエントまで培養し、ラジオアイソトープを添加する直前に新しく FBS を含まない培地に交換した。細胞に [^{14}C]-glucose と [^{14}C]-acetate を添加し、それぞれ 24 時間、8 時間インキュベートした。細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、細胞を回収した。タンパク質量は bicinchoninic acid 法 (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて測定した。次に、細胞内の総脂質を Bligh-dyer 法 (Bligh et al., 1959) で抽出した。0.5 ml のメタノールと 0.25 ml のクロロホルムを加え、2 分間激しく混合させた後、室温で 20 分以上インキュベートさせた。次に 0.2 ml のクロロホルムと 0.2 ml の PBS を加え vortex し、3000 rpm、20 分間室温で遠心後、クロロホルム層をパスツールピペットで回収した。窒素ガス下で溶媒を揮発させ、ヘキサン/メタノール (19:1) に再溶解した。5 ml の Ultima gold liquid scintillation counting cocktail (PerkinElmer) を加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka radioisotope counter machine) で放射能活性を測定した。測定値は DPM/ μg protein に換算した。

4-4. 定量リアルタイム PCR 法

RNeasy plus Mini kit (Qiagen) を用いて細胞から total RNA を抽出した。方

法はキットの使用説明書に従った。抽出した total RNA はデオキシリボヌクレアーゼ処理 (Promega) 後、NANODROP LITE (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA) を用いて mRNA の濃度を測定した。Transcriptor High Fidelity reverse transcriptase kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim Germany)、oligo d (T) プライマーを用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。方法はキットの使用説明書に従った。定量リアルタイム PCR (qPCR) は Applied Biosystems StepOnePlus™ real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った。Taqman® プロローブ (Applied Biosystems) には、nestin (Hs04187831_g1)、CD133 (prominin1) (Hs01009250_m1)、Sox2 (Hs00415716_m1)、FABP7 (Hs00361426_m1)、18SmRNA (Hs03928985_g1) を用いた。定量化は 18SmRNA の値から Ct 値 (この値を ΔCt 値とする) を補正し、さらにコントロールの ΔCt 値を目的のサンプルの ΔCt 値と比較する $\Delta\Delta Ct$ 法で、Applied Biosystems StepOnePlus™ real-time PCR system software v2.0 (Applied Biosystems) を用いて行った。

4-5. 免疫不全マウス (NOD-SCID mouse) への移植実験と解析

マウスは雄雌の NOD-SCID マウス (5 週齢、20~25 g) を使用した。NOD/SCID マウスは日本クレア (東京、日本) から購入した。移植は以下の手順で行った。麻酔薬を腹腔内注射し、脳定位固定装置に保定した。ハミルトンシリンジと 30G の針を用いて、1 匹あたり 100,000 個の細胞を含む PBS2 μ l を披殻 (Bregma から 1 mm 前方、2 mm 外側、硬膜から 2.5 mm 下方) に注射した。2 分間で接種し、さらに 5 分間針を留置後、針を抜いた。マウスをケージに戻し、健康状態を毎日観察しながら移植後 22 週まで飼育した。発生した脳腫瘍の表現系解析は、マウスを灌流固定後、脳のパラフィン切片を作成し免疫組織化学染色により行った。脱パラフィン後、抗 FASN 抗体 (Sigma-Aldrich, 1:100) を用いて 1 次抗体

反応を行い、ビオチン化抗 rabbit IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, 1:200) を用いて 2 次抗体反応を行った。免疫染色の可視化は diaminobenzidine (DAB) を用い、avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 法 (Vector Laboratories) で行った。

4-6. 免疫染色

免疫組織学的検討には、70 歳男性グリオブラストーマ患者の病理標本を用いた。ヒトグリオブラストーマ標本の FASN と Sox2 の二重染色は、以前我々が報告した論文に記載した方法に従って行った (Morihiro et al., 2013)。具体的には、パラフィン包埋した標本の脱パラフィンを行い、HISTOFINE (pH 9、ニチレイ、東京、日本) を用いて Microwave で 40 分間抗原賦活化を行った。Protein block を Protein Block Serum-Free Ready-To-Use (Dako) を使用して 10 分間した後、rabbit anti-FASN antibody (Sigma-Aldrich, 1:100) を用いて 60 分間の一次抗体反応をさせた。次に alkaline phosphatase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA, 1:50) を用いて 30 分間の二次抗体反応をさせた。Vulcan Fast Red Chromogen Kit 2 (BIOCARE MEDICAL, Concord, CA, USA) を用いて FABP7 を発色させた。二種類目の発色基質が一種類目の二次抗体の alkaline phosphatase (ALP) と交差反応するのを防ぐために denaturing solution kit (BIOCARE MEDICAL) を用いて 5 分間反応させて一種類目の二次抗体の ALP の活性をなくした。goat anti-Sox2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA, 1:100) を用いて 60 分間の一次抗体反応をさせた。次に ALP-conjugated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:50) を用いて 30 分間の二次抗体反応をさせた。PermaBlue/AP (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) を用いて Sox2 を発色させた。

最後に封入を行った。染色のポジティブコントロールとして小脳のグリオブラストーマの切片を用いた。

免疫細胞化学染色については、以下の手順で行った。細胞を 4% パラホルムアルデヒドを 15 分間、室温で固定した。非特異的免疫反応のブロッキングのために 5% 正常ヤギ血清を加えて 40 分間インキュベートした。一次抗体は rabbit anti-FASN (1:100)、mouse anti-nestin (Millipore Corporation Billerica, MA, USA, 1:200)、goat anti-Sox2 (1:500)、antibody or mouse anti-CD133 (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA, 1:50) を用い、4°C で一晩反応させた。二次抗体は Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG, or Alexa Fluor® 568 donkey anti-goat IgG (Invitrogen, 0.5 µg/ml) を用い、室温で 1 時間反応させた。核染色には 4', 6-Diamidino-2- phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, MO, USA) を使用した。Fluoromount (Diagnostic BioSystems, CA, USA) で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察、撮影した。画像の処理には ImageJ を用いた。

4-7. ウェスタンブロット法

100 mM Tris-Cl (pH 6.8)、4% SDS、20% glycerol、200 mM β-mercaptoethanol を含む buffer により細胞から蛋白を抽出した。タンパク質濃度は、BCA Protein assay (Pierce、Rockfold、IL、USA) で測定した。調整したサンプルを 15–30 µg ずつ 12% SDS-polyacrylamide ゲル上に展開し SDS-PAGE を行った。次に、Immobilon-PSQ polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, USA) へ転写し、5% skimmed milk によりブロッキングを行った。一次抗体は anti-FASN (Sigma-Aldrich, 1:1000)、anti-CD133 (Miltenyi Biotec, 1:100)、anti-FABP7 (Owada et al., 2006, 1:1000)、anti-nestin (Millipore, 1:5000)、anti-Sox2 (Millipore-Chemicon 1:1000)、

anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology, 1:2000) 抗体を用いて 4°Cで一晩反応させた。洗浄後に HRP 標識 2 次抗体 (Millipore, MA, USA) を室温 1 時間で反応させ、ECL reagents (GE Healthcare UK Ltd, Amersham Place, England) を用いてタンパク質バンドを検出した。

4-8. 細胞生存性試験

Cerulenin を添加後の GSCs の生存率を MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]アッセイにより検討した。MTS アッセイは、CellTiter 96 Aqueous nonradioactive cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。方法はキットの使用説明書に従った。96 ウェルプレートに 8,000 個ずつ細胞を播種し、20, 30, 40 μ M の cerulenin を添加、0、24、48、72 時間後にそれぞれ MTS を添加した。MTS を添加して 2.5 時間後、吸光度を 490 nm の波長で ARVO™ X Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) を用いて測定した。

4-9. 浸潤アッセイ

GSCs の浸潤は Matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) を用いて行った。8 μ m のポアサイズを持つ Transwell inserts (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) を 200 μ g/ml Matrigel でコーティングした。インサートの上層には DMEM/F-12 に FGF、EGF のみ加えた培地を入れ、下層には DMEM/F-12 に FGF、EGF、B27 サプリメント、hormone mix を加えた培地を入れた。GSCs は 1 ウェルに 20,000 個ずつ播種した。48 時間後、インサート膜の上層に残っている非浸潤細胞を除去し、インサート膜の下層に浸潤した細胞を固定し、1%トルイジンブルーで染色した。顕微鏡下でランダムに選択した 5 視野の写真を撮影し、そ

の細胞数を数えた。

4-10. sphere アッセイ

sphere アッセイは Singh らの方法 (Singh et al., 2003) を参考にした。GSCs (Y02、Y04、Y10 cells) を 96 ウェルプレートに 8,000 個ずつ播種し、0.2 ml の培養液を加えた。細胞は 37°C で 7 日間培養しスフェアの数と大きさを測定した。

4-11. 統計処理

全てのデータは平均値±標準誤差で算出した。2 群間の比較は student's t-test を行い、危険率 5%未満 ($P < 0.05$) をもって統計上有意差ありと判定した。

5. 結果

5-1. GSCs における *de novo* 脂肪酸合成の亢進

グルコースあるいは酢酸の炭素分子が脂質分画に取り込まれる割合を測定する *de novo* 脂質合成アッセイ (Brown et al., 2007) を行い、患者由来グリオーマ幹細胞 (GSCs) と血清添加により分化誘導を行った株 (dif-GSCs) で *de novo* 脂質合成量に差異が認められるかどうか確認した。培養液はアッセイを行う前に無血清の DMEM-F12 メディウムに交換した。 ^{14}C -glucose から脂質分画に取りこまれた量は、GSCs では G144、Y10、G179 それぞれ 65.38 ± 4.45 DPM/ μg 、 48.16 ± 3.76 DPM/ μg 、 86.52 ± 11.30 DPM/ μg であったのに対し、分化したグリオーマ細胞株である dif-G144、dif-Y10、dif-G179 ではそれぞれ 32.32 ± 0.82 DPM/ μg 、 12.38 ± 0.48 DPM/ μg 、 34.09 ± 1.38 DPM/ μg であり、GSCs と比較して *de novo* 脂質合成が低下した (Fig. 1A)。 ^{14}C -acetate を用いても G144、Y10、G179 それぞれ 271.73 ± 18.26 DPM/ μg 、 235.82 ± 30.84 DPM/ μg 、 323.07 ± 29.91 DPM/ μg であったのに対し、dif-G144、dif-Y10、dif-G179 ではそれぞれ 99.62 ± 0.98 DPM/ μg 、 52.86 ± 5.33 DPM/ μg 、 110.08 ± 29.65 DPM/ μg であり、同様の傾向が認められた (Fig. 1B)。これらの結果から dif-GSCs と比較して、GSCs では *de novo* 脂質合成が亢進していることが明らかになった。

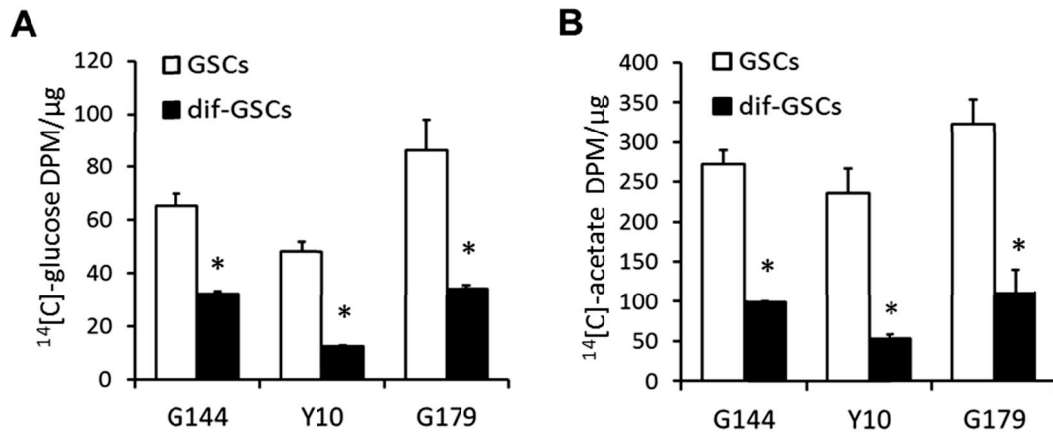


Fig. 1. *De novo* lipogenesis using glucose and acetate as carbon source in GSCs and differentiated non-GSCs

G144, Y10 and G179 cells were incubated with [¹⁴C]-glucose (A) or [¹⁴C]-acetate (B) for 24 or 8 h to measure glucose or acetate incorporation into total lipid, respectively. Data are represented as means ± SEM for three independent experiments for each cell line. * P < 0.01.

5-2. GSCs における脂肪酸合成酵素 (FASN) の発現

我々は *de novo* 脂質合成の律速酵素である FASN に着目した。ヒトグリオブラストーマ標本において FASN が強く発現しており、Sox2 との 2 重染色を行ったところ、FASN と Sox2 が腫瘍部で共局在していた (Fig. 2A)。FASN は腫瘍細胞の細胞質に、Sox2 は核に発現が認められた (Fig. 2A)。次に GSCs (G144、Y10) において、FASN の発現を qPCR とウェスタンブロットで確認した。FASN の mRNA は GSCs で強く発現しており、dif-GSCs では発現量が減少した (Fig. 3)。ウェスタンブロットでも同様に FASN の発現は GSCs で強く発現しており、dif-GSCs では未分化マーカーである CD133、Sox2、FABP7 の発現量減少とともに FASN の発現も減少した (De Rosa et al., 2012; Morihira et al., 2013; Brescia et al., 2013; Berezovsky et al., 2014)。免疫細胞化学染色 FASN は GSCs の細胞質に強く

発現し、未分化マーカーである Sox2、Nestin、CD133 と共局在していた。Dif-G144 ではこれら未分化マーカーの発現量の低下とともに FASN の発現低下も認めた。また、移植モデルマウスにおいても FASN は移植部位に強く発現していた (Fig. 4)。

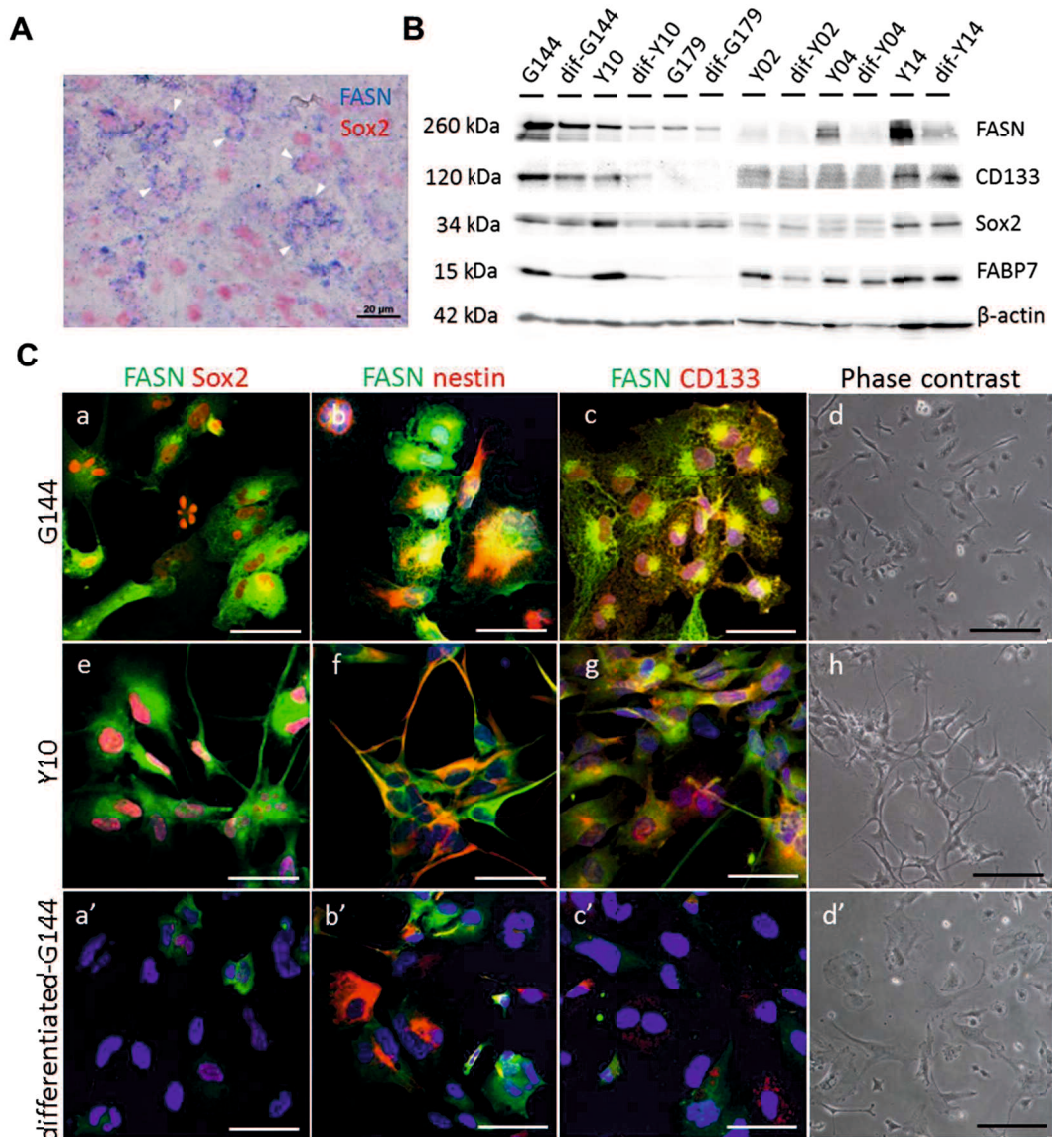


Fig. 2. Expression of FASN in human glioblastoma cells and GSC lines

(A) Human glioblastoma cells show the strong expression of FASN (blue) and the neural stem cell marker, Sox2 (red). Sox2 expression is confined to the nuclei, whereas FASN is expressed in the cytosol. The white arrows show FASN⁺Sox2⁺ cells. (B)

Western blotting showing the expression of FASN, CD133, Sox2, and FABP7 in G144, Y10, G179, Y02, Y04 and Y14 GSC lines. Upon differentiation in the presence of FBS, FASN expression, similar to that of CD133, Sox2, and FABP7, was down-regulated. Expression of β -actin was used as an internal control. (C) Expression of FASN in GSC lines before and after differentiation. GSCs show strong expression of FASN and other neural stem cell markers, Sox2, nestin and CD133. Upon differentiation in the presence of FBS, FASN expression is down-regulated, similar to that of Sox2, nestin, and CD133. Immunofluorescence micrographs showing the co-expression of FASN with Sox2 (a, e, a') and nestin (b, f, b') in G144 and Y10 GSC lines. Phase contrast micrographs showing the morphology of GSC lines (G144 and Y10) in the presence of EGF and FGF (d, h) or after differentiation in the presence of FBS (d'). Bars in a-c, e-g, a'-c' =50 μ m, Bars in d, h, d' =20 μ m

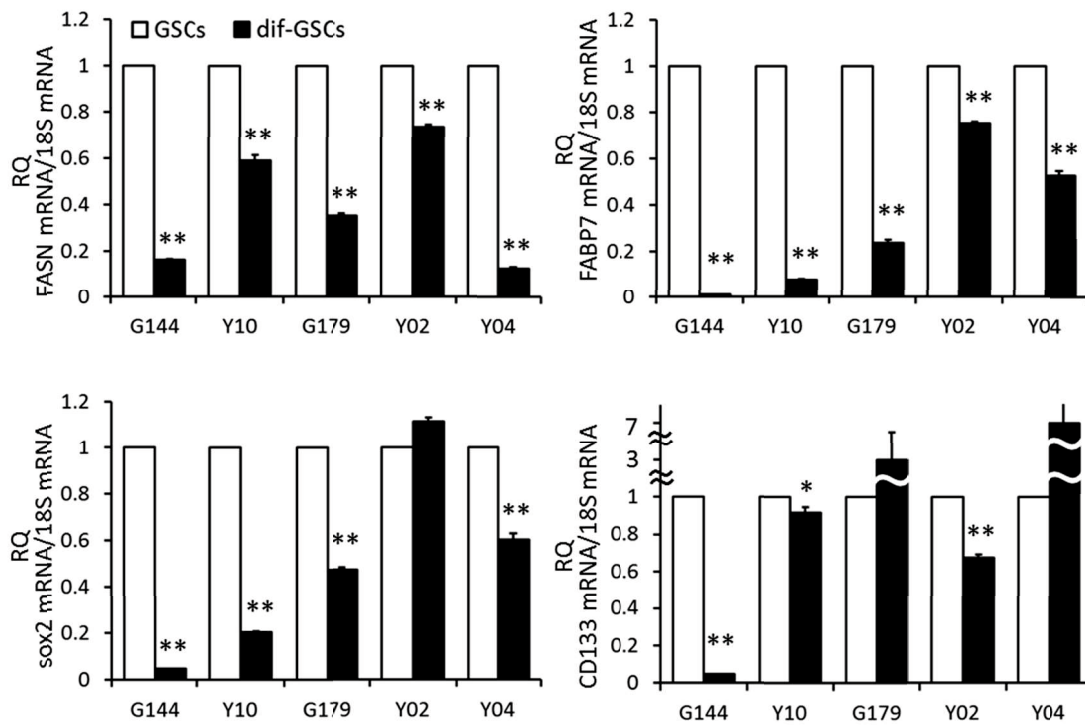


Fig. 3. Downregulation of FASN mRNA expression upon differentiation

qPCR results showing strong expression of FASN in G144, Y10 G179, Y02 and Y04 GSC lines. Upon differentiation in the presence of FBS, FASN mRNA expression, similar to that of FABP7, Sox2, and CD133 was down-regulated. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared with control.

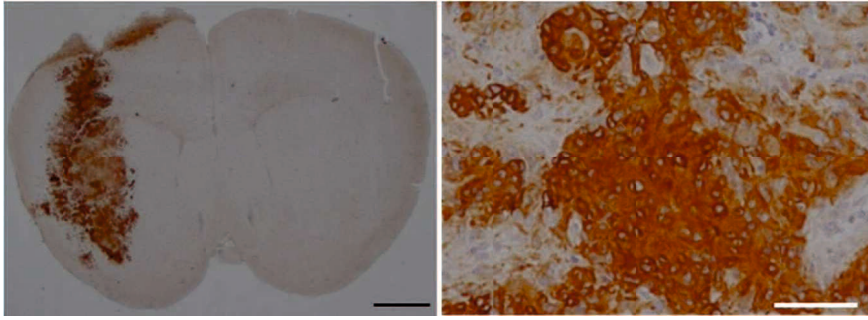


Fig. 4. Characteristics of the GSC lines

Localization of FASN in mouse brain transplanted with G144 GSCs. Right, magnified image of the area was enclosed by the rectangle. Black bar = 1 mm, white bar = 50 μm

5-3. FASN の阻害による GSCs 浸潤能の低下

Cerulenin は FASN の阻害剤であり、*de novo* 脂肪酸合成を阻害する薬剤である (Lupu et al., 2006)。グリオーマ幹細胞における FASN の機能を調べるため、cerulenin 投与し、MTS アッセイと浸潤アッセイを行った。Cerulenin の GSCs (G144、Y10) の増殖に対する効果を MTS アッセイを用いて検討した。G144、Y10 に 20、30、40 μM の cerulenin を 0、24、48、72 時間投与したところ 30、40 μM では、48 時間後から増殖能が大きく低下したのに対し、20 μM では低下しなかった (Fig. 5A)。一方、分化したグリオーマ細胞株である U87、U373 に 30 μM を添加しても、生存率が低下しなかった (Fig. 5B)。GSCs に 20 μM の cerulenin を 48 時間添加すると、細胞の形態変化を伴うことなく *de novo* 脂肪酸合成量が有意に、約 40%低下した (Fig. 5C)。したがって GSCs はグリオーマ細胞株 (U87、U373) と比較して cerulenin に対する感受性が高いことが判明した。さらにグリオーマ幹細胞の特徴の一つに、高浸潤能が挙げられる (Singh et al., 2003; Molina et al., 2010)。そこで Matrigel 浸潤アッセイを行ったところ、10、20 μM cerulenin 添加 48 時間後、G144 においてそれぞれ 40%、50%、浸潤能が低下した (Fig. 5D)。

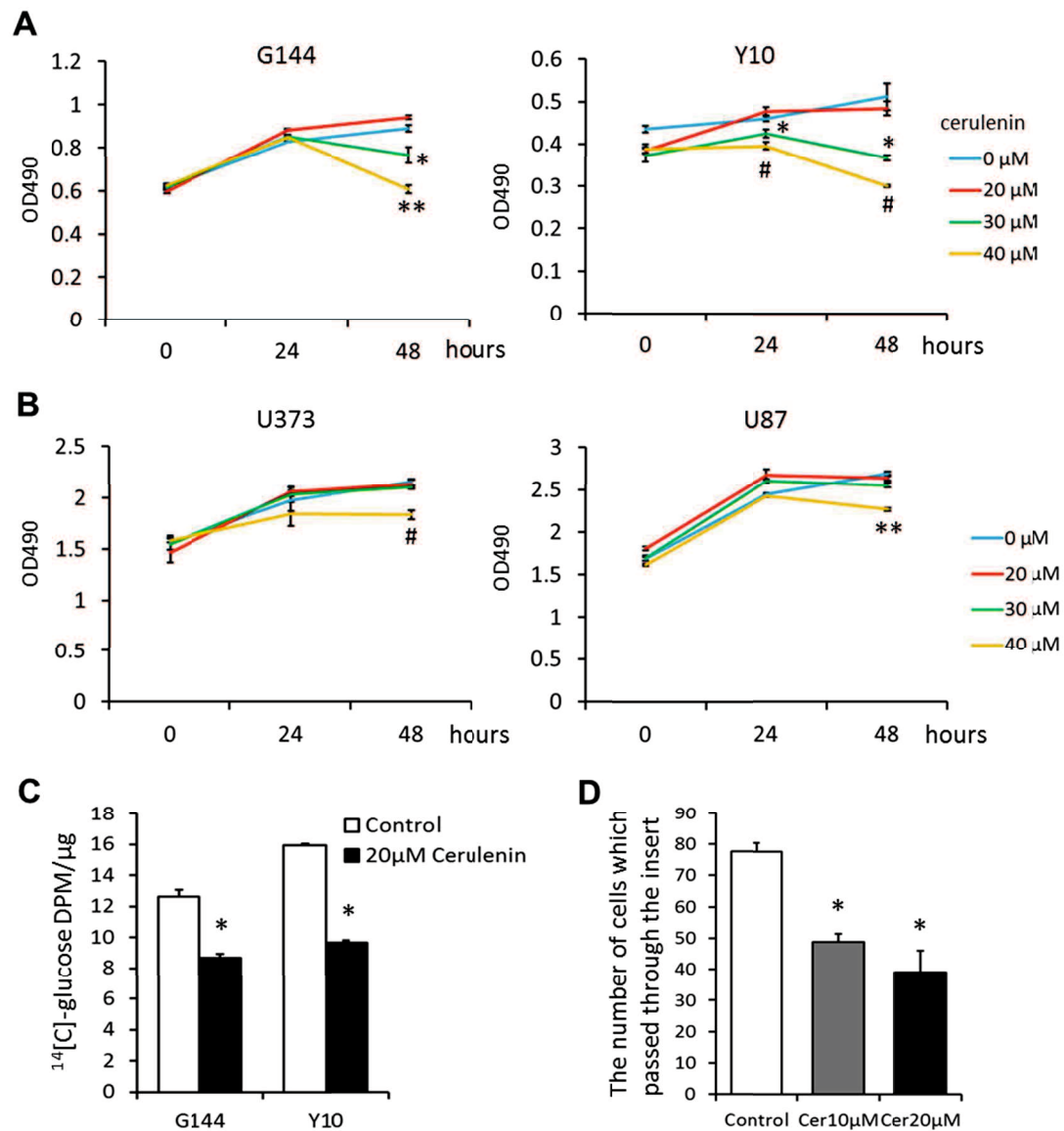


Fig. 5. Effects of cerulenin on GSC and glioblastoma cell viability and invasion

(A) Effects of cerulenin on GSC viability. Cell viability was assessed 0, 24, 48 h treatment with 0, 20, 30, 40 μM cerulenin by MTS assay. G144 and Y10 cell viability was significantly reduced by 30, 40 μM cerulenin. * P < 0.05, # P < 0.01, ** P < 0.001 (B) Cell viability was assessed 0, 24, 48 h treatment with 0, 20, 30, 40 μM cerulenin by MTS assay. U373 and U87 cell viability was significantly reduced by 40 μM cerulenin. # P < 0.01, ** P < 0.001 (C) *De novo* lipogenesis using glucose as carbon source in GSCs and GSCs incubated with 20 μM cerulenin. * P < 0.05 (D) Quantitative results of Matrigel invasion assay. Each column represents mean ± SEM for three independent experiments. * P < 0.05.

5-4. FASN の阻害による GSCs の sphere 形成能の低下

5-3.の結果から G144、Y10 における 30、40 μM での細胞増殖の減少は、細胞毒性による細胞死と考えられたため、以降の実験には 10、20 μM の濃度を用いた。GSCs (Y02、Y04、Y10) に 10、20 μM の cerulenin を添加し、sphere 形成能を調べたところ、GSCs の sphere 数が減少した (Fig. 6A、C)。10 μM の cerulenin では sphere の形態に大きな変化は認められなかったが、20 μM の cerulenin 投与で sphere の直径が有意に減少した (Fig. 6B、C)。

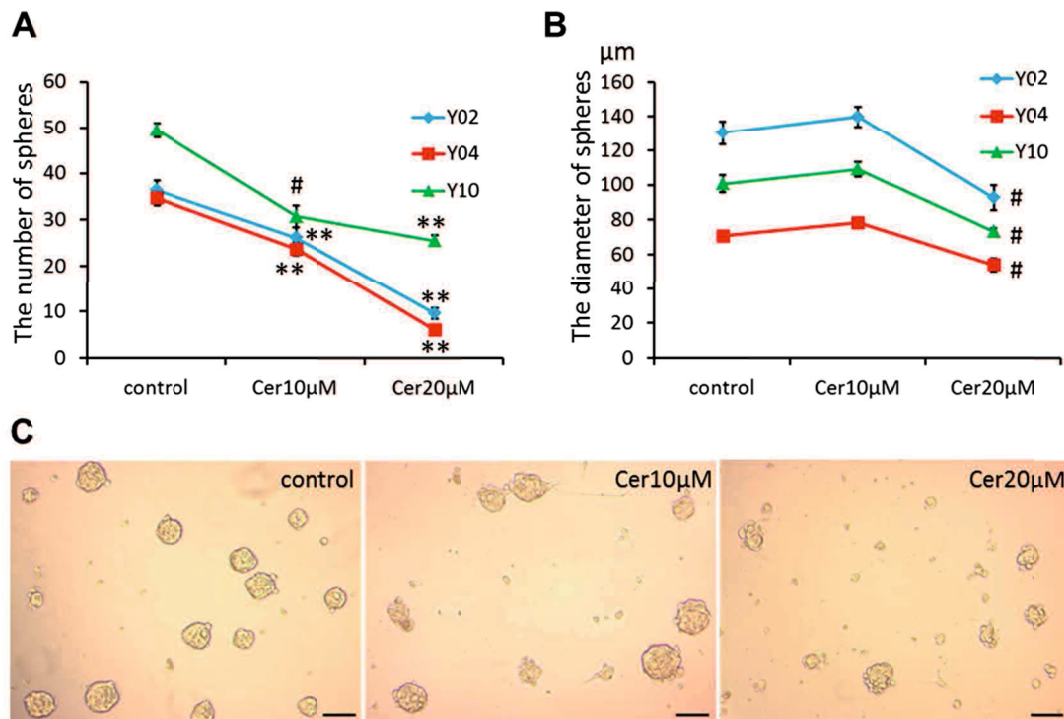


Fig. 6. Effects of cerulenin on sphere formation

The number of spheres (A) and the diameter of GSC sphere (B) treated with 0 (control), 10, 20 μM cerulenin. # $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ compared with control. (C) Representative phase contrast micrographs showing the morphology of Y10 in the control and the presence of 10 and 20 μM cerulenin. Bars = 100 μm

5-5. FASN の阻害による GSCs の未分化マーカーの発現低下

FASN の発現が GSCs の未分化能維持に関与しているかどうか調べるために、10 μ M cerulenin を 9 日間添加し、未分化マーカーの発現を qPCR とウェスタンブロットで確認した。Cerulenin を投与した G144 はコントロールと比較して qPCR で nestin、FABP7、CD133 の発現が低下し (Fig. 7A)、タンパク質レベルでも同様の結果が得られた (Fig. 7B)。逆にグリアの分化マーカーである GFAP (glial fibrillary acidic protein) の発現が上昇した (Fig. 7C) がニューロンの分化マーカーである NeuN の発現に変化はなかった (Fig. 7C)。以上の結果から、FASN が仲介する *de novo* 脂肪酸合成は GSCs の未分化能維持に必須であると考えられた。

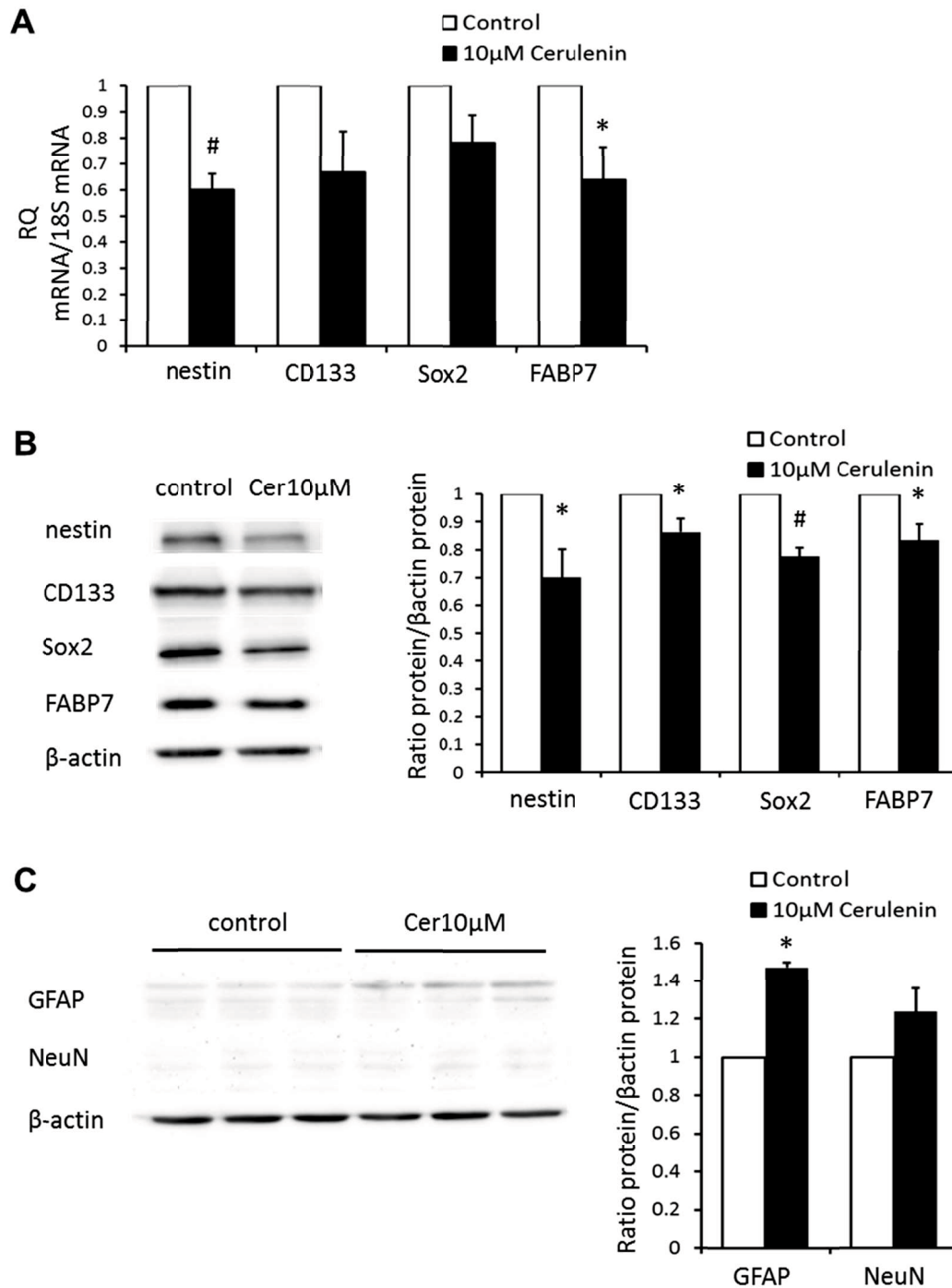


Fig. 7. Effects of cerulenin on stemness and differentiation status

(A) qPCR results showing the expression of nestin, CD133, Sox2 and FABP7 in G144 GSC lines before and after administration of cerulenin. * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ (B) The protein level of nestin, CD133, Sox2 and FABP7 was down-regulated by cerulenin. * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ (C). Expression of GFAP and NeuN in GSC lines before and after administration of cerulenin. * $P < 0.01$

6. 考察

今回我々は、1) グリオーマ幹細胞株は血清添加により分化誘導を行った株と比較し、*de novo* 脂質合成が亢進していること、2) GSCs において FASN が強発現していること、3) 血清添加により分化誘導を行うと、FASN の発現が低下すること、4) GSCs はグリオーマ細胞株より cerulenin に対する感受性が高いこと、5) FASN の阻害剤添加により浸潤能が低下したこと、6) FASN の阻害剤添加により幹細胞マーカーの発現が低下し、分化マーカーの発現が上昇したこと、を明らかにした。

癌細胞はしばしば特徴的な代謝異常を示す。その中でも最も研究が進んでいる現象が、解糖系によりグルコースを積極的に利用する Warburg 効果とよばれるものである (Warburg et al., 1956)。その他癌に共通する代謝異常の特徴としてグルタミン代謝の亢進が挙げられる。マウス乳癌幹細胞はグルタミン酸-システイン合成酵素の発現とグルタチオンの合成酵素が亢進している (Diehn et al., 2009)。脂質はエネルギー貯蔵、シグナル分子の産生、細胞膜構造の基質として非常に重要な役割を果たしており、細胞の異常増殖が起こる癌においても重要な物質である。グルコースとグルタミン代謝の異常が癌の特徴であるという報告が増えてきているのにも関わらず、脂質代謝の癌のバイオロジーにおける機能は解明されていない。本研究では我々は *de novo* 脂肪酸合成が GSCs から dif-GSCs への分化移行に関連しているかどうか確認し、*de novo* 脂肪酸合成は dif-GSCs と比較して GSCs で亢進していることを発見した。卵巣癌の幹細胞様細胞では添加した酢酸が酸化の代わりに *de novo* 脂肪酸合成に使用されていた (Liao et al., 2014)。さらに大腸癌幹細胞は、脂肪滴をより多く蓄えている点で分化した大腸癌細胞や正常細胞とは区別できるという報告もある (Tirinato et al.,

2015)。これらの結果と同様、今回の我々のデータでも、*de novo* 脂肪酸合成と細胞内脂肪酸代謝がグリオーマのバイオロジーに関与していることが示唆された。

今回我々は複数の患者由来 GSC において FASN が強発現していることを初めて明らかにした。浸潤能の高さと予後の悪さは、グリオブラストーマが低悪性度のグリオーマと比較して自己複製能の高い細胞塊を生み出す能力のある細胞をより多く含むことと密接に関係している (Singh et al., 2003; Molina et al., 2010)。Cerulenin による FASN の阻害により卵巣癌の移植モデルにおける腫瘍形成を遅延させ (Pizer et al., 1996)、ヒト乳癌細胞 (ZR-75-1、SKBR3、MCF-7) の細胞死を誘導し (Pizer et al., 1996)、大腸癌細胞株 HCT116、白血病細胞株 HL60、乳癌細胞株 MCF-7 の DNA 複製を抑制、アポトーシスを誘導したと報告されている (Pizer et al., 1998)。これらの所見と一致して、我々は今回 FASN の阻害が GSC の増殖能と浸潤能を抑制したことを証明した。しかしながら、そのメカニズムの詳細については、今後さらなる研究が必要である。

FASN は長鎖脂肪酸、主にパルミチン酸を合成し (Lupu et al., 2006)、特に分裂能の高い癌細胞の細胞膜の新規合成に必要なリン脂質の合成に関与する (Menendez et al., 2007)。非常に興味深いことに、悪性度の高いグリオーマ (Godbout et al., 1998) や GSCs (De Rosa et al., 2012) に高発現している脂肪酸の細胞内キャリアタンパク質である FABP7 が FASN と類似した発現パターンを示す。FABP7 は悪性度の高いアストロサイトーマの浸潤領域や、血管周囲で特に強く発現しており、GSCs で siRNA を用いてその発現を抑制すると細胞の増殖能と遊走能が低下した (De Rosa et al., 2012)。FASN と FABP7 が GSCs の増殖制御に協調的に関与しているかどうかは不明であるが、最近我々は FABP7 がアストロサイトにおいて、脂質ラフトと呼ばれる細胞膜マイクロドメインの機能を

調節していることを明らかにした (Kagawa et al., 2015)。また、FASN は前立腺癌細胞においてリン脂質、主にホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの産生を促進し、脂質ラフトに分配するという報告もある (Swinnen et al., 2003)。したがって GSC の増殖において、脂質ラフトが仲介するシグナルに FASN と FABP7 が機能的に協調して制御している可能性も考えられる。脂質ラフトと GSCs のバイオロジーにおける FABP7 と FASN の機能関連性については、今後さらに研究されるべきである。

我々は GSCs における *de novo* 脂肪酸合成の意義に着目したが、*de novo* 脂肪酸合成が GSCs の未分化性を維持する分子メカニズムについては、いまだ不明である。FASN の GSCs における機能をさらに研究することにより、グリオブラストーマのバイオロジーにおける脂肪酸代謝の意義を解明できると考える。機能脂質の同定、あるいは GSCs の脱分化・分化を促進するような脂質代謝経路を同定することができれば、グリオブラストーマの新規治療法の開発に役立つと期待される。

7. 結語

本研究では、患者由来グリオーマ幹細胞株を用いて、FASN を介した *de novo* 脂肪酸合成が GSCs の未分化能維持に関与していることを報告した。GSCs における *de novo* 脂肪酸合成の未分化性調節維持機構の解明がグリオーマ新規治療法の開発に寄与するだけでなく、他の癌のバイオロジーの理解や有効な新規治療法の開発にも重要であると考ええる。

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました山口大学大学院脳神経外科学教授 鈴木倫保先生、東北大学大学院医学系研究科器官解剖学分野教授 大和田祐二先生に深謝いたします。

また、グリオーマ幹細胞株の培養方法をご指導してくださいました山口大学大学院脳神経外科学分野助教 貞廣浩和先生に心より深く感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、実験方法や結果並びに本論文に対する貴重な御助言と御協力を頂きました、山口大学大学院医学系研究科器官解剖学分野の皆様心より感謝いたします。

9. 参考文献

Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A (2013) Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech* 6: 1353-1363.

Benedetti E, Galzio R, Laurenti G, D'Angelo B, Melchiorre E, et al. (2010) Lipid metabolism impairment in human gliomas: expression of peroxisomal proteins in human gliomas at different grades of malignancy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23: 235-246.

Berezovsky AD, Poisson LM, Cherba D, Webb CP, Transou AD, et al. (2014) Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia* 16: 193-206, 206 e119-125.

Biswas S, Lunec J, Bartlett K (2012) Non-glucose metabolism in cancer cells--is it all in the fat? *Cancer Metastasis Rev* 31: 689-698.

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.

Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, et al. (2013) CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells* 31: 857-869.

Brescia P, Richichi C, Pelicci G (2012) Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? *J Oncol* 2012: 376894.

Brown NF, Stefanovic-Racic M, Sipula IJ, Perdomo G (2007) The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism* 56: 1500-1507.

Cabarcas SM, Hurt EM, Farrar WL (2010) Defining the molecular nexus of cancer, type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Curr Mol Med* 10: 744-755.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85-95.

De Rosa A, Pellegatta S, Rossi M, Tunici P, Magnoni L, et al. (2012) A radial glia gene marker, fatty acid binding protein 7 (FABP7), is involved in proliferation and invasion of glioblastoma cells. *PLoS One* 7: e52113.

Diehn M, Cho RW, Clarke MF (2009) Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Semin Radiat Oncol* 19: 78-86.

Elsherbiny ME, Emara M, Godbout R (2013) Interaction of brain fatty acid-binding protein with the polyunsaturated fatty acid environment as a potential determinant of poor prognosis in malignant glioma. *Prog Lipid Res* 52: 562-570.

Godbout R, Bisgrove DA, Shkolny D, Day RS, 3rd (1998) Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. *Oncogene* 16: 1955-1962.

Grube S, Dunisch P, Freitag D, Klausnitzer M, Sakr Y, et al. (2014) Overexpression of fatty acid synthase in human gliomas correlates with the WHO tumor grade and inhibition with Orlistat reduces cell viability and triggers apoptosis. *J Neurooncol* 118: 277-287.

Kagawa Y, Yasumoto Y, Sharifi K, Ebrahimi M, Islam A, et al. (2015) Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1. *Glia* 63: 780-794.

Knobloch M, Braun SM, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, et al. (2013) Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* 493: 226-230.

Liao J, Qian F, Tchabo N, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, et al. (2014) Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism. *PLoS One* 9: e84941.

Lupu R, Menendez JA (2006) Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr Pharm Biotechnol* 7: 483-493.

Menendez JA, Joven J, Cufi S, Corominas-Faja B, Oliveras-Ferreros C, et al. (2013) The Warburg effect version 2.0: metabolic reprogramming of cancer stem cells. *Cell Cycle* 12: 1166-1179.

Menendez JA, Lupu R (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 7: 763-777.

Menendez JA, Vazquez-Martin A, Ortega FJ, Fernandez-Real JM (2009) Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes, and cancer. *Clin Chem* 55: 425-438.

Mita R, Beaulieu MJ, Field C, Godbout R (2010) Brain fatty acid-binding protein and omega-3/omega-6 fatty acids: mechanistic insight into malignant glioma cell migration. *J Biol Chem* 285: 37005-37015.

Mita R, Coles JE, Glubrecht DD, Sung R, Sun X, et al. (2007) B-FABP-expressing radial glial cells: the malignant glioma cell of origin? *Neoplasia* 9: 734-744.

Molina JR, Hayashi Y, Stephens C, Georgescu MM (2010) Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. *Neoplasia* 12: 453-463.

Morfouace M, Lalier L, Bahut M, Bonnamain V, Naveilhan P, et al. (2012) Comparison of spheroids formed by rat glioma stem cells and neural stem cells reveals differences in glucose metabolism and promising therapeutic applications. *J Biol Chem* 287: 33664-33674.

Morihiro Y, Yasumoto Y, Vaidyan LK, Sadahiro H, Uchida T, et al. (2013) Fatty acid binding protein 7 as a marker of glioma stem cells. *Pathol Int* 63: 546-553.

Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, et al. (2010) Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* 140: 49-61.

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, et al. (2000) The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 31: 1068-1073.

Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF (1998) Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res* 58: 4611-4615.

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, et al. (1996) Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res* 56: 2745-2747.

Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, et al. (1996) Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res* 56: 1189-1193.

Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, et al. (2009) Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4: 568-580.

Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, et al. (1997) Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 150: 201-208.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.

Sadahiro H, Yoshikawa K, Ideguchi M, Kajiwara K, Ishii A, et al. (2014) Pathological features of highly invasive glioma stem cells in a mouse xenograft model. *Brain Tumor Pathol* 31: 77-84.

Sandberg CJ, Altschuler G, Jeong J, Stromme KK, Stangeland B, et al. (2013) Comparison of glioma stem cells to neural stem cells from the adult human brain identifies dysregulated Wnt- signaling and a fingerprint associated with clinical outcome. *Exp Cell Res* 319: 2230-2243.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, et al. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828.

Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, et al. (2002) Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 20: 1375-1382.

Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, et al. (2002) Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 98: 19-22.

Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, et al. (2003) Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 898-903.

Tirado-Velez JM, Joumady I, Saez-Benito A, Cozar-Castellano I, Perdomo G (2012) Inhibition of fatty acid metabolism reduces human myeloma cells proliferation. *PLoS One* 7: e46484.

Tirinato L, Liberale C, Di Franco S, Candeloro P, Benfante A, et al. (2015) Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. *Stem Cells* 33: 35-44.

Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley CA, et al. (2011) Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* 6: e20914.

Vazquez-Martin A, Corominas-Faja B, Cufi S, Vellon L, Oliveras-Ferraro C, et al. (2013) The mitochondrial H⁽⁺⁾-ATP synthase and the lipogenic switch: new core components of metabolic reprogramming in induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell Cycle* 12: 207-218.

Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, et al. (2011) Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16062-16067.

Wakil SJ (1989) Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 28: 4523-4530.

Wang Y, Kuhajda FP, Li JN, Pizer ES, Han WF, et al. (2001) Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett* 167: 99-104.

Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314.

Ward RJ, Dirks PB (2007) Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu Rev Pathol* 2: 175-189.

Wolf A, Agnihotri S, Guha A (2010) Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 1: 552-562.

Ye XQ, Li Q, Wang GH, Sun FF, Huang GJ, et al. (2011) Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int J Cancer* 129: 820-831.

Zhao W, Kridel S, Thorburn A, Kooshki M, Little J, et al. (2006) Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy. *Br J Cancer* 95: 869-878.