

令和元年6月24日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08408

研究課題名(和文) 癌幹細胞を育む微小環境の解析 癌幹細胞ニッチ制御機構を解明する

研究課題名(英文) Analysis of the tumor microenvironment promoting the cancer stem cells

研究代表者

千葉 知宏 (Chiba, Tomohiro)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60398617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌幹細胞化を促進・維持する微小環境(ニッチ)の制御機構を解析した。これまでに癌幹細胞(Cancer stem cell: CSC)が通常の癌細胞からStat3, p53などのストレス応答シグナルを介してエピジェネティックに誘導されることを確認した。
「化学療法や低酸素などのストレスによってCSCニッチが形成される」との仮説を検証するため、グリオブラストーマ(GBM)の幹細胞性獲得条件、メカニズムの解析を実施した結果、低酸素、抗癌剤処理、酸性液処理などの各種細胞ストレスによるSTAT3およびSTAT5の活性化が各種幹細胞マーカーの上昇を誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GBMの標準治療は、放射線療法とtemozolomide (TMZ)の併用療法(Stuppレジメン)である。しかしながら、GBMを治療により根治することは未だ困難である。特に再発は大きな問題となっており、癌幹細胞が再発の大きな要因になっていると推定されている。本研究で得られた細胞ストレスによってStat3/Stat5の活性化が起こり、癌幹細胞を誘導する微小環境がもたらされるという知見は今後の治療薬開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we analyzed the microenvironment promoting cancer stem cells (CSC). Previous data have shown that CSC can be induced from cancer cells through epigenetic regulation induced by Stat3 and p53.

To test if CSC niche is induced by cellular stress such as chemotherapy and hypoxia, we carried out detailed analysis of the GBM-CSC induction. As a result, we revealed that GBM-CSC is induced by anti-cancer drugs, hypoxia and acidic buffer via activation of Stat3 and Stat 5. These data provide a novel insight into chemotherapy of GBM.

研究分野：実験病理学

キーワード：cancer stem cell tumor microenvironment glioblastoma Stat3 p53

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞 (Cancer stem cell, CSC と略す) とは、癌組織内において癌原性 (Tumorigenicity) を持ち、分化によって癌組織内の不均一性 (Heterogeneity) を作り出す細胞を意味し、癌の治療抵抗性を説明する仮説として注目されている (Gupta et al., Nat Med 15: 1010-1012, 2009)。最近、乳癌細胞の研究から CSC と非 CSC 分画の可逆的平衡状態が存在することが明らかとなった (Gupta et al., Cell 146: 633-644, 2011)。つまり、CSC は正常幹細胞のように元から存在し維持されるのではなく、特定の条件下に、通常の癌細胞から誘導・供給されることが示唆された (可逆性癌幹細胞化)。

癌の CSC 化には、炎症、抗癌剤など様々なストレスが関与するが、その維持には、CSC を育む癌微小環境 (CSC ニッチ) が重要である。ごく最近、癌関連マクロファージ (TAM) 細胞膜が CSC ニッチを提供すると報告された (Lu et al. Nat Cell Biol, 2014 Sep 28[Epub ahead of print])。癌組織は、TAM の他にも線維芽細胞、新生血管、壊死細胞など多彩な成分を含むことから、より詳細な検討が求められている。現在、CSC 標的療法の開発が進んでいるが、ゲノム不安定性を持つ CSC よりも正常ゲノムを持つニッチを標的とする治療には利点がある。

グリオブラストーマ (神経膠芽腫 glioblastoma, GBM) は、最も頻度の高い原発性脳腫瘍であり、生存期間が 12~15 ヶ月と極めて予後不良である (Brantley and Benveniste, Mol Cancer Res 6: 675-684, 2008)。進行が早く、浸潤性が強いいため、既存の手術、抗癌剤、放射線の併用療法に対しても抵抗性である。GBM は癌幹細胞仮説に従う代表的悪性腫瘍として研究が進められて来た。最近、GBM において BMX Tyr キナーゼによる Stat3* (Signal transducer and activator of transcription 3) の活性化が GBM 幹細胞の維持に関与することが報告された (Guryanova et al., Cancer Cell 19: 498-511, 2011)。多くの GBM 細胞が Stat3 抑制により死滅すること、Stat3 高発現の GBM は予後不良であること (Birner et al., J Neurooncol 100: 339-343, 2010) も知られている。Stat3 は IL-6 を代表とする炎症性サイトカインによって活性化される分子であり、TAM の誘導に関与する (Fujiwara et al., Biomed Res Int, 2014.)。

<用語の説明>

*Stat3 は、ES 細胞維持に必須である leukemia inhibitory factor (LIF) の標的分子であり、幹細胞性維持に重要な機能を果たす (Hirai et al., Biochem J 438: 11-23, 2011)。C 末端側のチロシン残基 (Tyr) がリン酸化によって活性化、二量体化して転写因子として機能する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「GBM における CSC ニッチの解明」である。特に、ニッチ構成成分の特定、CSC 誘導機構の解析を実施する。CSC 仮説は癌の治療抵抗性を簡潔・明瞭に説明するものとして注目されているが、研究の重点は CSC マーカーの探索に置かれている。本研究では、CSC がエピジェネティックな変化によって通常の癌細胞より誘導されるとの知見に基づき、CSC を育む微小環境 (ニッチ) の詳細を検討する。低酸素、炎症等の内因や抗癌剤、放射線といった外因によるストレスは IL-6 などの炎症性サイトカインにより癌周囲の微小環境を変化させており、これが CSC ニッチの形成に寄与する可能性が高い。癌治療の最大の問題はゲノム不安定性に基づく治療耐性の獲得であるが、CSC ニッチを標的とする抗 CSC 治療は、正常細胞を対象とする為、耐性獲得の懸念が少ない。本研究の成果は、全く新しい理論に基づく癌治療薬の開発、応用へと直結する事が期待できる。

3. 研究の方法

- (1) ヒト GBM 検体における CSC ニッチの形態学的解析: CD133 および SSEA-1 を用いた GBM 幹細胞染色と各種細胞マーカーとの多重染色により、ニッチ構成成分を明らかにする。
- (2) GBM ニッチ再現系の確立: TORAY 社製 ECM シートを使用し、膜の表裏に順次、細胞を播種することによりニッチ再現系を構築する。
- (3) ニッチ再現系を用いたニッチシグナルの解析: で構築したニッチ再現系から DNA/RNA/タンパク質を回収し、CSC 誘導・維持能に影響を及ぼす遺伝子の同定を試みる。

4. 研究成果

- (1) ヒト GBM 検体における CSC ニッチの形態学的解析
GBM 幹細胞の細胞表面マーカーとしては、CD133 を用いた flow cytometry による方法が一般的である。しかし、免疫組織学的な検出が難しい等の問題があった (Beier et al., Cancer Res 67: 4010-4015, 2007)。CD133、SSEA-1 およびリン酸化 Stat3 染色を実施し、ヒトパラフィン包埋検体における GBM 幹細胞を染色したところ、幹細胞が壊死部や血管近傍に比較的多く存在し、また、マクロファージ (CD68) も周囲に認められた。

- (2) GBM ニッチ再現系の確立

Toray 社製の細胞外基質 (ECM) 膜の両側に細胞を播種する系を実施し、焦点をずらすことにより、live cell imaging が可能であること、ECM 膜の両面から核酸やタンパク質を抽出することが可能であることを確認した。GBM 細胞と血管内皮ないしマクロファージを両面培養したところ、両面ともに GBM 細胞を播種した際と比較して、統計学的に有意な差は認められなかった。

(3) ニッチから発せられる CSC 誘導シグナル・CSC 維持シグナルの解析

両面培養によるニッチ再現系を用い、Temozolomide 処理、低酸素処理 (低酸素チャンバー 02 5%, 24 hours)、酸性液処理の効果を検討した。血管内皮ないしマクロファージと両面培養した GBM 細胞においてより強い Stat3 および Stat5 の活性化が認められた。IL-6 を中心とする炎症性サイトカインの分泌による効果と考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Iijima S, Chiba T, Maruyama K, Saito K, Kobayashi K, Yamagishi Y, Shibahara J, Takayama N, Shiokawa Y, Nagane M. Hepatosplenic gamma-delta T-cell lymphoma involving the brain: a case report. World Neurosurg 118: 139-142, 2018. (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

Saito K, Shimizu S, Nozaki E, Kobayashi K, Kume S, Chiba T, Shibahara J, Shiokawa Y, Nagane M. Mechanism of acquired mutation after TMZ treatment. (GENE-33) Society for Neuro-Oncology Annual Meeting 2018 (2018/11/15-2018/11/18, New Orleans).

Nagane M, Saito K, Shimizu S, Nozaki E, Kobayashi K, Kume S, Chiba T, Shibahara J, Shiokawa Y. Detailed analysis of mutation change after treatment in glioblastoma. (P04.19) Society for Neuro-Oncology Annual Meeting 2018 (2018/11/15-2018/11/18, New Orleans).

Saito K, Suzuki K, Shimizu S, Kobayashi K, Shimada D, Kume S, Iijima S, Chiba T, Shibahara J, Shiokawa Y, Nagane M. Temozolomide-induced mismatch repair insufficiency and hypermethylation of MGMT promoter with hypermutation in malignant gliomas. (GENE-61) Society for Neuro-Oncology Annual Meeting 2017 (2017/11/16-2017/11/19, San Francisco).

Nagane M, Saito K, Shimizu S, Nozaki E, Kobayashi K, Kume S, Chiba T, Shibahara J, Shiokawa Y. Detailed analysis of mutation change after treatment in glioblastoma. 13th EANO Meeting 2018, Stockholm, SWEDEN, October 10-14, 2018.

Okamura M, Kobayashi K, Saito K, Shimada D, Suematsu S, Chiba T, Shibahara J, Shimizu S, Shiokawa Y, Nagane M: びまん性正中膠腫 H3-K27M 変異の臨床病理学的検討. 第 36 回 日本脳腫瘍病理学会, 東京, 2018 年 9 月 25 日-27 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

特記事項なし。

取得状況 (計 0 件)

特記事項なし。

〔その他〕

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Tomohiro_Chiba

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし。

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菅間 博

ローマ字氏名：Kamma Hiroshi

研究協力者氏名：住石 歩

ローマ字氏名：Sumiishi Ayumi

研究協力者氏名：笹本 薫子

ローマ字氏名：Sasamoto Kaoruko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。