

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08997

研究課題名(和文) 膠芽腫幹細胞が眠る Invasion niche の機能解析と幹細胞破綻環境の探索

研究課題名(英文) Analysis of Invasion niche and exploration of cancer stem cell

研究代表者

井上 明宏 (Akihiro, Inoue)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20593403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫(Glioblastoma:GBM)の再発は摘出腔辺縁部からの局所再発が最も多く、その原因としては、腫瘍摘出後に残存した腫瘍幹細胞(Glioma Stem-like Cell:GSC)の関与が示唆されている。これまでに我々は浸潤性の高い膠芽腫の腫瘍辺縁部には、CD44を高発現するGSCが存在することを明らかにしてきたが、同細胞群の膠芽腫再発機序への関与については未だ定かではない。そこで、今回、低酸素環境下でCD44と特異的結合を示すosteopontin(OPN)に着目し、その発現および機能を解析することで、膠芽腫再発の分子病態について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CSCは発癌における責任細胞であり、ニッチを形成する微小環境と腫瘍幹細胞性獲得との関係などを個体レベルで解明していくことは、臨床的にも腫瘍細胞生物学的にも大きな発展が期待できる。さらに本研究の最大の独自の特色は「Invasion nicheに潜むGSCが神経膠腫浸潤の主因である」という仮定に基づき、in vivo 光イメージングシステムや小動物用MRIを用い、細胞浸潤を時空間的に腫瘍組織全体で解明しようとしている点にある。将来的には血管新生阻害剤や他の新規分子標的薬とCSCの幹細胞性破綻とを組み合わせた新しい神経膠腫治療の開発に繋げることも可能であり、社会的意義は絶大である。

研究成果の概要(英文)：We showed that GSCs that express high levels of CD44 are present in the tumor periphery. We also found that vascular endothelial growth factor (VEGF) is characteristically expressed at a high level in the tumor periphery. Cultured GSCs obtained from the tumor periphery were highly invasive and have enhanced migration phenotype, both of which were markedly inhibited by CD44 knockdown. Higher expression of CD44 in the tumor periphery than in the core was correlated with a highly invasive feature on MRI and was associated with early tumor progression and worse survival, whereas lower expression of CD44 in the tumor periphery corresponded to low invasion and was associated with longer survival. The low invasion type on MRI tended to show high levels of VEGF expression in the tumor periphery, thus presenting the tumor with high proliferative activity.

研究分野：脳神経外科

キーワード：腫瘍幹細胞 Glioblastoma CD44 High invasive type

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫の治療において DNA メチル化剤テモゾロミド (TMZ) の導入は大きなブレイクスルーであったが、TMZ 耐性症例も多く化学療法剤単独による悪性神経膠腫治療への限界が示唆されている。また、悪性神経膠腫の腫瘍生物学的特性を利用した分子標的治療薬 (MMP 阻害剤、EGFP 受容体阻害剤、血管新生阻害剤など) の有効性も期待されていたが、病態の一時的な改善効果は得られるものの有意な生存延長効果は確認されず、十分な抗腫瘍効果を有する分子標的治療薬は見いだせていない。一方、悪性神経膠腫を含む様々な腫瘍組織において幹細胞様の細胞群である CSC が発見されており、新たな治療ターゲットとして注目されている。CSC の発見により、腫瘍組織はモノクローナルな集団ではなく、CSC とその孫細胞が混在する複雑な集団であることが明らかとなった。CSC における遺伝子・分子レベルでの解明は急速に進み、薬剤・放射線耐性能や腫瘍形成能などの様々な生物学的特性も解明されてきている。さらに、幹細胞性の維持に低酸素誘導因子が重要であるとの報告もなされ、血管や間質などの腫瘍を取り巻く微小環境が腫瘍幹細胞性を支えるニッチ (niche) として重要であるという認識も定着しつつある。そのため、悪性神経膠腫の治療抵抗性の主因である細胞浸潤の病態解析には、培養細胞レベルの解析だけではなく、細胞外基質やニッチを取り巻く微小環境を含めた腫瘍組織全体での浸潤様式を時間的・空間的に考えていく必要が出てきている。

現在、最悪性の悪性神経膠腫である膠芽腫においては、CSC 自身の生存維持に関わる 2 つの明確なニッチが報告されている。1 つは Perivascular niche であり、ここに局在する CSC は腫瘍新生血管の内皮細胞に近接し、腫瘍増大に必要な血管新生を無秩序に促進させる機能がある。もう 1 つは Perinecrotic niche であり、同部位の CSC は自身の生存維持のために自己複製能を促進させる役割を担っている。この 2 つのニッチは、最近の multi-modality のナビゲーション手術により、多くの場合、腫瘍と共にほぼ全摘出できているはずであるが、近年の著しい後療法の進歩にも拘らず治療成績の抜本的な改善には繋がっていない。そこで、膠芽腫の再発様式を見直してみると、腫瘍再発の大部分は摘出腔辺縁からの局所再発であることが明確であり、このことから腫瘍辺縁の浸潤領域にもう一つのニッチ、すなわち Invasion niche が存在するのではないかと推測した。我々は、この Invasion niche に局在する CSC が膠芽腫の真の治療ターゲットになり得ると考えており、同部位の CSC の存在や機能を解明することが、膠芽腫に対する新たな治療戦略に繋がるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究は Invasion niche に潜在する CSC の特徴や同細胞群の幹細胞性維持機構を分子レベルのみならず生体イメージングを用いて時空間的にも解明し、CSC の浸潤抑制のみならず幹細胞性の破綻を誘導する革新的な分子標的治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト膠芽腫摘出組織およびヒト膠芽腫摘出組織由来の CSC を用いることで以下の事象を明らかにする。

ヒト膠芽腫摘出組織内における CSC の niche を同定し、各 niche (Perivascular niche、Perinecrotic niche、Invasion niche) に存在する CSC の特徴を検討する。

ヒト膠芽腫患者から PET/MRI fusion 画像を利用したナビゲーションシステムを用いて、Invasion niche を正確に同定しつつ組織採取を行い、腫瘍組織より Sphere 法を用いて CSC を単離、同細胞群の特性を評価し、Invasion niche 由来の CSC 細胞株として樹立させる。

樹立した Invasion niche 由来 CSC における各種幹細胞マーカーの発現 (CD133、CD44、Oct-3/4、Sox-2 など) を評価し、膠芽腫摘出組織内の Invasion niche における発現性と合致するかを検討すると共に、既に当教室で樹立済みの CSC (図 1) の特性との比較を行う。

確立した Invasion niche 由来 CSC の浸潤能、血管新生能を通常環境および低酸素環境下の 2 条件で評価し、分子標的治療のターゲットになり得る特異的標的因子を探索する。浸潤能は matrigel を用いた chemoinvasion assay 法にて定量解析を行い、血管新生能に関しては、各種血管新生因子 (HIF-1、HIF-2、VEGF など) の発現量やラット腹部大動脈片を用いた 3 次元培養により評価する。さらに、同細胞群を NOD-SCID マウス脳内へ移植し、in vivo での細胞浸潤、血管新生の様子を MRI 画像と病理組織学的評価にて解析する。

候補となる治療標的因子を RNA 干渉法にて抑制し、同因子の抑制に伴う影響を in vitro にて検討する。最も関連性の高い因子については恒常的発現抑制細胞株を樹立し、マウス脳内に移植することで、同因子が最大の治療標的となり得るかを in vivo でも検討する。

腫瘍脳内移植マウスに CSC の可視化蛍光プローブを投与することでイメージングモデルを確立させ、Invasion niche 由来 CSC のガン微小環境における局在および浸潤動態を in vivo 光イメージングを用いて解析する。

4 . 研究成果

膠芽腫患者では、腫瘍摘出腔辺縁部に CD44 高発現の CSC が多く存在する症例があり、同細胞群が高い浸潤性、早期再発に関与していると思われた。CSC は発癌における責任細胞であり、ニッチを形成する微小環境と腫瘍幹細胞性獲得との関係などを個体レベルで解明していくことは、臨床的にも腫瘍細胞生物学的にも大きな発展が期待できる。さらに本研究の最大の独自の特色は「Invasion niche に潜む CSC が神経膠腫浸潤の主因である」という仮定に基づき、in vivo 光イメージングシステムや小動物用 MRI を用い、細胞浸潤を時空間的に腫瘍組織全体で解明しようとしている点にある。将来的には血管新生阻害剤や他の新規分子標的薬と CSC の幹細胞性破綻とを組み合わせた新しい神経膠腫治療の開発に繋げることも可能であり、社会的意義は絶大である。今後は、腫瘍辺縁部に残存した CD44 発現腫瘍幹細胞の制御機構には周辺の酸素環境が関わっていることが分かり、その詳細を解明することで新たな治療戦略の確立を模索する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue Akihiro, Ohnishi Takanori, Kohno Shohei, Ohue Shiro, Nishikawa Masahiro, Suehiro Satoshi, Matsumoto Shirabe, Ozaki Saya, Fukushima Mana, Kurata Mie, Kitazawa Riko, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Kunieda Takeharu	4. 巻 44
2. 論文標題 Met-PET uptake index for total tumor resection: identification of 11C-methionine uptake index as a goal for total tumor resection including infiltrating tumor cells in glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosurgical Review	6. 最初と最後の頁 587 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10143-020-01258-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Akihiro, Kohno Shohei, Ohnishi Takanori, Nishida Naoya, Suehiro Satoshi, Nakamura Yawara, Matsumoto Shirabe, Nishikawa Masahiro, Ozaki Saya, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Senba Hidenori, Nakaguchi Hironobu, Taniwaki Mashio, Matsuura Bunzo, Kitazawa Riko, Kunieda Takeharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Tricks and traps of ICG endoscopy for effectively applying endoscopic transsphenoidal surgery to pituitary adenoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosurgical Review	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10143-020-01382-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Masahiro, Inoue Akihiro, Ohnishi Takanori, Yano Hajime, Kanemura Yonehiro, Kohno Shohei, Ohue Shiro, Ozaki Saya, Matsumoto Shirabe, Suehiro Satoshi, Nakamura Yawara, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Kitazawa Riko, Tanaka Junya, Kunieda Takeharu	4. 巻 10
2. 論文標題 CD44 expression in the tumor periphery predicts the responsiveness to bevacizumab in the treatment of recurrent glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 2013 ~ 2025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Akihiro, Kohno Shohei, Nishida Naoya, Suehiro Satoshi, Matsumoto Shirabe, Nishikawa Masahiro, Ozaki Saya, Nakamura Yawara, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Senba Hidenori, Matsuura Bunzo, Ohnishi Takanori, Kunieda Takeharu	4. 巻 190
2. 論文標題 Clinical utility of new three-dimensional model using a zero-echo-time sequence in endoscopic endonasal transsphenoidal surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neurology and Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 105743 ~ 105743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clineuro.2020.105743	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kusakawa Akari, Inoue Akihiro, Nakamura Yawara, Nishida Naoya, Fukushima Mana, Senba Hidenori, Suehiro Satoshi, Matsumoto Shirabe, Nishikawa Masahiro, Ozaki Saya, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Matsuura Bunzo, Kitazawa Riko, Kunieda Takeharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical features and endoscopic findings of granular cell tumor of the sellar region: A case report and review of the literature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Neurology International	6. 最初と最後の頁 101 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25259/SNI_111_2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue A, Ohnishi T, Kohno S, Matsumoto S, Nishikawa M, Ohue S, Ozaki S, Suehiro S, Kurata M, Fukushima M, Kitazawa R, Shigekawa S, Watanabe H, Kunieda T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Prognostic significance of immunohistochemical subtypes based on the stage of B-cell differentiation in primary CNS lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Clin Exp Pathol	6. 最初と最後の頁 1457-1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Y, Iwata S, Inoue A, Ohue S, Fukumoto S, Ichikawa H, Onoue S, Ozaki S, Kohno K.	4. 巻 47
2. 論文標題 A Case of Right Frontal Dermoid Cyst with Temporal Imaging Changes in the Disease Course	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 No Shinkei Geka	6. 最初と最後の頁 769-776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masahiro Nishikawa, Akihiro Inoue, Takanori Ohnishi, Shohei Kohno, Shiro Ohue, Shirabe Matsumoto, Satoshi Suehiro, Daisuke Yamashita, Saya Ozaki, Hideaki Watanabe, Hajime Yano, Hisaaki Takahashi, Riko Kitazawa, Junya Tanaka, Takeharu Kunieda	4. 巻 23
2. 論文標題 Significance of Glioma Stem-Like Cells in the Tumor Periphery That Express High Levels of CD44 in Tumor Invasion, Early Progression, and Poor Prognosis in Glioblastoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5387041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishikawa Masahiro, Inoue Akihiro, Ohnishi Takanori, Yano Hajime, Ozaki Saya, Kanemura Yonehiro, Suehiro Satoshi, Ohtsuka Yoshihiro, Kohno Shohei, Ohue Shiro, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Kitazawa Riko, Tanaka Junya, Kunieda Takeharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Hypoxia-induced phenotypic transition from highly invasive to less invasive tumors in glioma stem-like cells: Significance of CD44 and osteopontin as therapeutic targets in glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101137 ~ 101137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Akihiro, Nishikawa Masahiro, Ohnishi Takanori, Yano Hajime, Kanemura Yonehiro, Ohtsuka Yoshihiro, Ozaki Saya, Nakamura Yawara, Matsumoto Shirabe, Suehiro Satoshi, Yamashita Daisuke, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Kitazawa Riko, Tanaka Junya, Kunieda Takeharu	4. 巻 153
2. 論文標題 Prediction of Glioma Stemlike Cell Infiltration in the Non-Contrast-Enhancing Area by Quantitative Measurement of Lactate on Magnetic Resonance Spectroscopy in Glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e76 ~ e95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2021.06.044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井上明宏、高野昌平、西田直哉、末廣諭、松本調、渡邊英昭、國枝武治
2. 発表標題 ETSSにおけるzero-echo-time sequenceを利用した術前3D-MRI画像の有用性
3. 学会等名 第30回 日本間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上明宏、高野昌平、末廣諭、西田直哉、大西丘倫、松本調、中村和、渡邊英昭、國枝武治
2. 発表標題 下垂体腺腫に対するETSS施行時におけるICG蛍光内視鏡使用のコツとピットフォール
3. 学会等名 社団法人日本脳神経外科学会 第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上明宏、末廣諭、尾崎沙耶、渡邊英昭、西川真弘、高野昌平、大西丘倫、大上史朗、渡邊英昭、國枝武治
2. 発表標題 膠芽腫摘出術におけるMethionine-PETの意義：Met 集積率と浸潤性腫瘍幹細胞の関連性
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上明宏、末廣諭、福島万奈、北澤理子、渡邊英昭、國枝武治
2. 発表標題 Multicentric Gliomaとして発見されたEpithelioid Glioblastomaの1例
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上明宏、中村和、西田直哉、末廣諭、渡邊英昭、國枝武治
2. 発表標題 トルコ鞍部に発生したGranular cell tumor (GCT) の 1例：GCTの内視鏡下手術所見と画像的特徴
3. 学会等名 第32回日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上明宏
2. 発表標題 PCNSLにおけるB細胞分化過程に基づいた新たなサブタイプ分類とその臨床的意義
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上明宏
2. 発表標題 膠芽腫再発に関わるCD44高発現腫瘍幹細胞の浸潤能と増殖能：異なる低酸素環境下でのオステオポンチンの発現と機能から
3. 学会等名 第8回 Neuro-Oncology WEST
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上明宏
2. 発表標題 ETSSにおける合併症回避のための工夫：術前画像としての3D-CT/MRI fusion imageの有用性
3. 学会等名 社団法人日本脳神経外科学会 第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上明宏
2. 発表標題 Significance of human chorionic gonadotropin as a predictor of resistance to standard chemo-radiotherapy for pure germinoma
3. 学会等名 The 16th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上明宏
2. 発表標題 Pure Germinomaに対する標準治療施行時におけるHCG- の有用性 ~ 予後推定因子としてHCG- の役割 ~
3. 学会等名 第29回 日本間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishikawa M, Inoue A, Kohno S, Ohue S, Ohnishi T, Kunieda T
2. 発表標題 Analysis of site-specific expression of cancer stem cell markers in glioblastoma
3. 学会等名 36th Annual Meeting of the Japan Society of Brain Tumor Pathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川真弘、井上明宏、高野昌平、大上史朗、松本調、末廣諭、山下大介、尾崎沙耶、渡邊英昭、大西丘倫、國枝武治
2. 発表標題 膠芽腫 Invasion nichelに残存する腫瘍幹細胞の発現および機能解析
3. 学会等名 第77回 日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川真弘、井上明宏、高野昌平、大上史朗、末廣 諭、大西丘倫、國枝武治
2. 発表標題 膠芽腫辺縁部の腫瘍幹細胞に高発現するCD44の特性-CD44は新規治療の標的となり得るか
3. 学会等名 第36回 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西川 真弘 (Nishikawa Masahiro) (20794308)	愛媛大学・医学系研究科・寄附講座助教 (16301)	
研究分担者	國枝 武治 (Kunieda Takeheru) (60609931)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------