

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591261

研究課題名（和文）神経芽細胞腫の腫瘍幹細胞が持つ細胞特性に基づく治療の確立

研究課題名（英文）Isolation of neuroblastoma stem cell to compare with neural stem cell

研究代表者

青山 峰芳 (AOYAMA MINEYOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70363918

研究成果の概要（和文）：神経芽細胞腫由来腫瘍幹細胞および神経幹細胞の細胞特性を解析し、神経芽細胞腫由来腫瘍幹細胞と神経幹細胞との類似点と相違点を明らかにすることで、神経芽細胞腫の悪性化メカニズムを解明することを目的とした。正常の神経幹細胞の単離については、胎生期のマウス全脳および成体マウス側脳室外側から neurosphere 法によって神経幹細胞を単離した。一方、マウス神経芽細胞腫由来腫瘍幹細胞の単離については、腫瘍幹細胞の表面マーカーによる単離および neurosphere 法に類似した方法である機能的な単離を試みたが、単離できなかった。株化した神経芽細胞腫株の中にはヒト神経芽細胞腫摘出腫瘍内に見られる腫瘍幹細胞がほとんど存在しない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We had a plan to isolate putative cancer stem cells from mouse neuroblastoma cell lines. And also we would isolate mouse neural stem cells from mouse embryonal and adult brain. Following the isolation of both stem cells, we would find the similarity and the difference between neuroblastoma cancer stem cells and neural stem cells. We have isolated mouse neural stem cells. However, we have failed to isolate neuroblastoma cancer stem cells using the sorting method by the specific cell surface marker or the neurosphere method. We suggest that after frequent passages, cancer cell lines could lose the cancer stem cells, which can be found in human primary tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：神経芽細胞腫、腫瘍幹細胞、神経幹細胞、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

神経芽細胞腫は小児期に発生する最多の固形腫瘍であり、胎生期の神経堤細胞由来の腫瘍と考えられている。1歳以前に発症する予後良好な腫瘍が存在する一方で、1歳以降に発症する腫瘍は手術療法および化学療法に対して抵抗性を示し難治性である。神経芽細胞腫は他の疾患で死亡した胎児の腹腔内で観察される *in situ neuroblastoma* の報告からわかるように、胎生期から既に腫瘍細胞が存在し、胎生期および出生後も増殖をつづけ発見されると考えられている。近年の腫瘍幹細胞の発見により、腫瘍幹細胞は必ずしも増殖能がそれほど高くないが積極的な手術療法、化学療法の後も残存し、増殖能の高い娘細胞を供給することで腫瘍増殖を維持していると考えられている。神経芽細胞腫にも腫瘍幹細胞が存在すると仮定するならば、1歳以前に発症する予後良好の神経芽細胞腫は胎生期に既に腫瘍細胞が存在し急激に増殖し、以前に行われていたマスキングによって容易に検出される腫瘍となるが、腫瘍幹細胞は当初は存在するが個体の発生段階における急激な環境変化によって消失するのではないかと仮定することができる。一方、1歳以降に発症する神経芽細胞腫は同様に胎生期にその元となる腫瘍細胞は存在し、個体の発生段階における急激な環境変化によっても腫瘍幹細胞を保持し続け増殖を続け、1歳以前の発症例と比較すると増殖のスピードが劣るため1歳以降になって初めて検出され診断に至るのではとないかという仮説を考えるに至った。腫瘍の悪性度は必ずしも腫瘍増殖能のみに依存するのではなく、転移能および薬剤耐性も重要な因子である。一方、近年成体での神経幹細胞の存在が明らかになり、再生医療への応用が期待されている。成体にも同様に神経幹細胞が存在するが、成人以降の神経芽細胞腫の発症はきわめてまれである。成人以降はグリオーマがほとんどで直接的な神経細胞由来の脳腫瘍の報告がほとんどないことから、我々は、神経芽細胞腫が胎児期の神経幹細胞と近い細胞特

性を保持していて、成体での神経幹細胞とは異なる細胞特性を持っていると予測している。そこで、申請者は、神経芽細胞腫の細胞特性を解析することにより神経芽細胞腫の悪性化メカニズムを解明したいと考えるに至った。

2. 研究の目的

ヒト神経芽細胞腫摘出腫瘍内に見られる腫瘍幹細胞をマウス神経芽細胞腫株からも同様の方法で単離する。同時に、マウスの胎生期および成体の脳から神経幹細胞を *neurosphere* 法により単離する。得られた腫瘍幹細胞、胎生期神経幹細胞、成体神経幹細胞の3種類の幹細胞について、細胞特性を解析し類似点と相違点を明らかにすることを目的とする。小児期に頻発し成人以降には極めてまれに発症する神経芽細胞腫が胎児期の神経幹細胞と近い細胞特性を保持していて、成体での神経幹細胞とは異なる細胞特性を持っていると予測している。その細胞特性に注目し、神経芽細胞腫の悪性化メカニズムを解明することを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 胎生マウスおよび成体マウスの脳からの神経幹細胞の単離

胎生14日齢のマウス全脳および日齢21日のマウス側脳室外側から *neurosphere* 法によって神経幹細胞を単離した。マウス脳を摘出し、実態顕微鏡下で胎生14日齢のマウスからは全脳を、日齢21日のマウスからは側脳室外側部のみを採取し、物理的および酵素処理により単細胞化し、FGF2およびEGF存在下で1週間培養する。作成した *neurosphere* からなる神経幹細胞から total RNA を抽出し、Agilent 社 Bioanalyser によって total RNA の質を確認し、分光吸光度計によって濃度を確定したあと、Agilent 社製マウスマイクロアレイ解析のために保存した。

(2) マウス神経芽細胞腫株からの腫瘍幹細胞の単離

すでに当研究室が保有するマウス神経芽

細胞腫株 N1E115 を用いて実験を行った。Singh らの報告のように腫瘍幹細胞特異的マーカーを用いて特定の細胞のみをソーティングすることを試みた (Singh et al. Nature 432:396-401, 2004)。ミルテルニーバイオテック社製のマグネットビーズを用いて、グリオーマ腫瘍由来腫瘍幹細胞の表面マーカーであると報告のある抗 CD133 抗体で腫瘍幹細胞を単離しようとした。

次に、Mansford らの報告のように neurosphere 法に類似した方法である機能的な単離法を試みた (Cancer Res. 67:11234-43, 2007)。フラスコで培養したマウス神経芽細胞腫株 N1E115 を回収し、単細胞化し、神経幹細胞の培養方法と同様な FGF2 および EGF 存在下で培養する。浮遊性の neurosphere に類似した腫瘍塊を形成させて腫瘍幹細胞を単離する方法を行った。

4. 研究成果

我々は、神経芽細胞腫由来腫瘍幹細胞および神経幹細胞の細胞特性を解析し、神経芽細胞腫由来腫瘍幹細胞と神経幹細胞との類似点と相違点を明らかにすることで、神経芽細胞腫の悪性化メカニズムを解明することを目的に研究を進めた。

(1) 胎生マウスおよび成体マウスの脳からの神経幹細胞の単離

正常の神経幹細胞の単離については、それぞれ胎生 14 日齢のマウス全脳および日齢 21 日の成体マウス側脳室外側から neurosphere 法によって神経幹細胞を単離した。抗 nestin 抗体を用いた細胞染色によって神経幹細胞由来の neurosphere であることを確認し、total RNA を回収し保存した。

(2) マウス神経芽細胞腫株からの腫瘍幹細胞の単離

神経芽細胞腫由来腫瘍幹細胞の単離については、初年度において、マウス神経芽細胞腫株 N1E115 からミルテルニーバイオテック社製のマグネットビーズを用いて、グリオーマ腫瘍由来腫瘍幹細胞の表面マーカーであると報告のある抗 CD133 抗体で腫瘍幹細胞を単離しようとしたが、良好な結果は得られなかった。一方で、Mansford らはヒト由来神経芽細胞腫の腫瘍初期化細胞の存在を明らかにし、神経幹細胞の培養方法と同様な培養条件で neurosphere に類似した腫瘍塊を形成させて腫瘍初期化細胞を単離する方法を報告

した (Cancer Res. 67:11234-43, 2007)。神経芽細胞腫由来腫瘍幹細胞にはグリオーマ腫瘍由来腫瘍幹細胞とは異なる表面マーカーが存在することが示唆され、neurosphere 法に類似した方法である機能的な単離法によって幹細胞集団を回収し、細胞集団の解析を行う必要があると考えた。そのため、次年度は同様な方法を用いてマウス神経芽細胞腫株 N1E115 から腫瘍幹細胞を単離する実験を行った。残念ながら、sphere を形成する細胞集団を確認できなかった。株化した神経芽細胞腫株の中にはヒト神経芽細胞腫摘出腫瘍内に見られる腫瘍幹細胞がほとんど存在しない可能性が示唆された。細胞株は頻回な継代培養の過程の中で腫瘍幹細胞が消失していることが考えられた。今後は、ヒト神経芽細胞腫摘出腫瘍由来の腫瘍幹細胞とヒト iPS 細胞由来神経幹細胞との比較を行い同様な解析を継続する計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Ohara, K., Aoyama, M., Fujita, M., Sobue, K., Asai, K. Prolonged exposure to ammonia increases extracellular glutamate in cultured rat astrocytes. Neurosci Lett 462:2(2009)109-112 査読有
- ② Kakita, H., Aoyama, M., Hussein, M. H., Kato, S., Suzuki, S., Ito, T., Togari, H., Asai, K. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced nitric oxide production through NF-kappaB signaling in cultured astrocytes. Toxicol Appl Pharmacol 238:1(2009)56-63 査読有
- ③ Waguri-Nagaya, Y., Yamagami, T., Tsuchiya, A., Nozaki, M., Goto, H., Kobayashi, M., Aoyama, M., Tada, T., Otsuka, T. Silicone-induced foreign-body reaction after first metatarsophalangeal jointarthroplasty for Jaccoud's arthropathy. Rheumatol Int

- ④ Nakao, K., Aoyama, M., Fukuoka, H., Fujita, M., Miyazawa, K., Asai, K., Goto, S. IGF2 modulates the microenvironment for osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 378(2009)462-466 査読有
- ⑤ Sugiyama, Y., Mizuno, H., Hayashi, Y., Imamine, H., Ito, T., Kato, I., Yamamoto-Tomita, M., Aoyama, M., Asai, K. and Togari, H. Severity of virilization of external genitalia in Japanese patients with salt-wasting 21-hydroxylase deficiency. *Tohoku J Exp Med* 215:4(2008)341-348 査読有
- ⑥ Morishima, T., Aoyama, M., Iida, Y., Yamamoto, N., Hirate, H., Arima, H., Fujita, Y., Sasano, H., Tsuda, T., Katsuya, H., Asai, K. and Sobue, K. Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 61(2008)18-26 査読有
- ⑦ Harry, G. J., Funk, J. A., Lefebvre d'Hellencourt, C., McPherson, C. A., Aoyama, M. The type 1 interleukin 1 receptor is not required for the death of murine hippocampal dentate granule cells and microglia activation. *Brain Res* 1194(2008)8-20 査読有
- ⑧ Harry, G. J., d'Hellencourt, C. L., McPherson, C. A., Funk, J. A., Aoyama, M., Wine, R. N. Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons. *J Neurochem* 106:1(2008)281-298 査読有
- ⑨ Harry, G. J., Lefebvre, d'Hellencourt, C., Wine, R., Aoyama, M. Tumor Necrosis Factor Receptor in Trimethyltin-induced Dentate Granule Cell Death. *Medimond International Proceedings* (2007)303-308 査読有
- ⑩ Tanikawa, T., Waguri-Nagaya, Y., Kusabe, T., Aoyama, M., Asai, K., Otsuka, T. Gliostatin/thymidine phosphorylase-regulated vascular endothelial growth-factor production in human fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol Int* 27(2007)553-559 査読有
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 青山峰芳, 垣田博樹, 加藤 晋, 戸苺 創, 浅井清文. ジクロフェナックナトリウムがアストロサイトの NO 産生に及ぼす影響 -インフルエンザ感染に伴う脳症悪化のメカニズム-. 第 14 回グリア研究会 11.14, 2009 大阪
- ② 長原正静, 永谷祐子, 山上貴也, 青山峰芳, 多田豊曠, 浅井清文, 大塚隆信. TNF- α は線維芽細胞様滑膜細胞においてアクアポリン 9 の発現を誘導する. 第 24 回日本整形科学学会基礎学術集会 2009.11.5-6, 2009 横浜
- ③ 青山峰芳, 垣田博樹, フセインモハメド, 加藤 晋, 鈴木 悟, 伊藤哲也, 戸苺 創, 浅井清文. ジクロフェナックがサイトカイン刺激によってアストロサイトから誘導される NO 産生を増強する -インフルエンザ脳症増悪化メカニズムの解析-. 第 52 回日本神経化学会 (伊香保) 大会 6.21-24, 2009 伊香保
- ④ 垣田博樹, 青山峰芳, 加藤 晋, 鈴木 悟, 戸苺 創, 浅井清文. 炎症性サイトカインと COX 阻害剤がアストロサイトの NOx 産生に及ぼす影響. 第 112 回日本小児科学会学術集会 4.17-19, 2009 奈良
- ⑤ McPherson C. A., Aoyama M., Grissom S. F., Gohlke J., Harry G. J. Differential inflammatory gene expression in young and middle aged mice during injury-induced hippocampal neurogenesis. The American Society for Neurochemistry 40th Annual Meeting, 3.7-11, 2009, Charleston, SC, USA

- ⑥ Fujita, M., Ogasawara, O., Tanaka, M., Aoyama, M., Iwasato, T., Asai, K., Yamada, K., Itoharu, S. Analysis of a BAC transgenic mouse line in adulthood: distribution of genomic recombination by gfap-promotor-derived cre in the brain. Neuroscience 2008, the Society for Neuroscience's 38th annual meeting, 11.15-19, 2008 Washington, DC, U.S.A.
- ⑦ Aoyama, M., Kakita, H., Kato, S., Fujita, M., Sobue, K., Asai, K. Region-specific expression of a water nervous system. Neuroscience 2008, the Society for Neuroscience's 38th annual meeting, 11.15-19, 2008 Washington, DC, U.S.A.
- ⑧ 青山峰芳、垣田博樹、加藤 晋、藤田政隆、祖父江和哉、浅井清文. アストロサイトの脳内部位特異性の解析. 第13回グリア研究会 11.8, 2008 東京
- ⑨ 長原正静、永谷祐子、山上貴也、青山峰芳、浅井清文、多田豊曠、大塚隆信. 関節水症におけるアクアポリン発現の検討. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 10.22-24, 2008 京都
- ⑩ 山上貴也、永谷祐子、長原正静、青山峰芳、浅井清文、大塚隆信. FK 506 はリウマチ由来線維芽細胞様滑膜細胞において gliostatin 産生を抑制する. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 10.22-24, 2008 京都
- ⑪ 藤田政隆、間瀬光人、磯村健一、青山峰芳、浅井清文、山田和雄. カオリン水頭症モデルラットにおけるアクアポリン発現に関する検討. 日本脳神経外科学会第67回学術総会 10.1-3, 2008 盛岡
- ⑫ 青山峰芳、垣田博樹、加藤 晋、藤田政隆、祖父江和哉、浅井清文. アストロサイトの部位特異性に関わる分子の同定. 第51回日本神経化学学会大会 9.11-13, 2008 富山
- ⑬ 祖父江和哉、森島徹朗、青山峰芳、高柳猛彦、浅井清文. 乳酸アシドーシスは水チャンネル<アクアポリン>のアストロサイト細胞膜への集積を促進する. 第31回日本神経科学大会 7.9-11, 2008 東京
- ⑭ Dexamethasone Inhibits Down Regulation of AQP3 Stimulated by TNF- α Murai, H., Aoyama, M., Terada, A., Hussein, A.H, Fujisawa, T., Asai, K., Togari, H. AAAAI(American academy of allergy asthma & immunology) annual meeting 2008 3.14-18, 2008 Philadelphia USA
- ⑮ 青山峰芳、Sherry Grissom, Julia Gohlke、浅井清文、G. Jeen Harry. 海馬での神経新生に関わる脳障害による顆粒下層での分子メカニズムの変化. 第50回日本神経化学学会 9.10-12, 2007 横浜
- ⑯ 森島徹朗、祖父江和哉、飯田裕子、大原健太郎、高柳猛彦、平手博之、青山峰芳、有馬 一、藤田義人、津田喬子、勝屋弘忠、浅井清文. 乳酸アシドーシスは培養アストロサイトにおける水チャンネルアクアポリン4の発現を増加させる. 第50回日本神経化学学会 9.10-12, 2007 横浜
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
- なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 青山 峰芳 (AOYAMA MINEYOSHI)
- 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
- 研究者番号：70363918
- (2)研究分担者
- 浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)
- 名古屋立大学・大学院医学研究科・教授
- 研究者番号：70212462