

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591683
研究課題名（和文） 腫瘍幹細胞を標的とした悪性グリオーマ浸潤に対する効果的治療法の開発
研究課題名（英文） Development of effective therapy for glioma invasion based on a glioma-derived tumor stem cell
研究代表者
大西 丘倫 (OHNISHI TAKANORI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70233210

研究成果の概要：

最近、悪性脳腫瘍においても腫瘍幹細胞の存在を裏付ける証拠が報告され、新たな治療ターゲットとして注目されている。腫瘍幹細胞は腫瘍中にわずかに含まれる自己複製能、多分化能を有した細胞群で、腫瘍の増大、放射線治療や化学療法後の再発に大きな役割を演じていると考えられている。そこで、今回、ヒト悪性グリオーマ手術摘出組織の初代培養ならびにヒト悪性グリオーマ細胞株 U251 細胞を用いて、腫瘍幹細胞の分離・同定を試みた。それぞれの細胞を無血清増殖因子添加培地にて培養することにより、腫瘍幹細胞の性質を有する細胞群の分離が行えた。本グリオーマ幹細胞は、CD133 陽性細胞であり、自己複製能、神経細胞への分化能を示した。また、ヌードマウス皮下での腫瘍形成能において、親細胞では 10^6 個の細胞移植で約半数に腫瘍形成がみられたのに対し、グリオーマ幹細胞では 10^4 個の細胞移植により全例で腫瘍形成がみられた。本グリオーマ幹細胞は *in vitro* において強い運動能および浸潤能を示し、ラット脳スライスモデルにおいても高い浸潤能を示した。そのメカニズムとして、グリオーマ幹細胞においては matrix metalloproteinase13 が高発現しており、この酵素の阻害剤により、ラット脳スライスモデルにおける浸潤能の抑制が見られたことより、腫瘍浸潤の一因を担っていることが示唆された。また、これらのグリオーマ幹細胞は、親細胞と比較して、OCT3 の高発現がみられ、腫瘍幹細胞化に重要な役割を担っていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性グリオーマ、腫瘍幹細胞、腫瘍浸潤、腫瘍増殖、マトリックスメタロプロテアーゼ、

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の発生及び治療抵抗性の原因に腫瘍内に存在し得る癌幹細胞の関与が提唱され、悪性グリオーマにおいても腫瘍幹細胞の存在が報告されている。これら腫瘍幹細胞は自己複製能および多分化能を有しており、初期治療寛解後の腫瘍再発の責任細胞になっていることが考えられる。悪性グリオーマ、特に膠芽腫は極めて治療抵抗性の悪性腫瘍で、その原因解明ならびに新しい治療法の確立が急務となっている疾患である。悪性グリオーマ細胞の中に腫瘍幹細胞が実際に存在し、それが本腫瘍の難治性に関与しているか否か、また、腫瘍幹細胞がどのような特性を有しているかを明らかにすることは、治療法の開発に繋がる重要な研究と考えられる。

2. 研究の目的

悪性グリオーマにおいてもニッチと考えられる腫瘍周囲に腫瘍幹細胞が浸潤細胞として存在している可能性がある。そこで、本研究では、ヒト膠芽腫の手術摘出材料ならびにヒト悪性グリオーマ細胞株を用いて腫瘍幹細胞を同定・分離し、その特性を明らかにすることを目的とする。また、分化能、自己複製能、腫瘍形成能を調べるとともに、特に、腫瘍の運動能、浸潤能との関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト悪性グリオーマ（膠芽腫）の手術摘出標本の初代培養ならびにヒト悪性グリオーマ細胞株（U251）より、SP法あるいはneurosphere法を用いて、腫瘍幹細胞の分離・同定を行った。細胞培養は、表皮成長因子、血小板由来成長因子-AA、塩基性線維芽細胞成長因子を含む無血清培地を用いた。

(2) 得られた sphere 細胞（腫瘍幹細胞と想定される）の遺伝子発現を検討した（CD133, Sox2, Oct3, cMyc）。自己増殖能については Alamar blue 法にて、神経細胞への分化は

cAMP 上昇剤を用いて行った。

(3) ノードマウス皮下での腫瘍形成能を調べるため、103-106 の細胞を下腹部皮下に移植し、腫瘍形成に至る日数、腫瘍のサイズを計測した。

(4) sphere 細胞の運動能、浸潤能（in vitro）腫瘍細胞の運動能は Boyden Chamber 法を、浸潤能はマトリゲルを用いた chemoinvasion assay 法を用いて行った。

(5) 特に脳内浸潤能の評価法として、ラット脳スライスモデルを用いて検討した。生後 2 日目のラット脳を摘出し全脳のスライス切片を作成し、培養後 7 日目のスライスを腫瘍細胞と共培養した。GFP で標識した腫瘍の浸潤過程は、共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。

(6) 浸潤に関与する因子として、各種の MMP、integrin の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト悪性グリオーマの初代培養ならびにグリオーマ細胞株 U251 細胞において、自己複製能、多分化能を有する幹細胞様の sphere 細胞を分離し得た。

(2) これらのグリオーマ幹細胞は、CD133 を発現するとともに、親細胞に比べ Oct3 の高発現がみられた。

(3) U251 細胞株由来の sphere 細胞は 1 万個の細胞数でノードマウス皮下で腫瘍を形成した。一方、親細胞では、 10^6 個の細胞数の移植でも腫瘍形成は半数にしかみられなかった。

(4) 上記グリオーマ幹細胞は、親細胞と比較して、in vitro assay 系にて、有意に高い運動能、浸潤能を示した。

(5) ラット脳スライスモデルでは、グリオーマ幹細胞は親細胞に比べ、脳スライス内への強い浸潤が見られ、定量的解析においても有意に浸潤能の亢進が確認できた。

(6) グリオーマ幹細胞は、ほぼ全てのインテグリンの発現亢進を示した。また、MMPsの中で、特異的に MMP13 の強い発現を認めた。

(7) MMP13 の阻害剤を用いた、ラット脳スライスモデルでの浸潤実験では、グリオーマ幹細胞の浸潤は本阻害剤により有意に抑制された。

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 6 件)

① Seno T, Harada H, Kohno S, Teraoka M, Inoue A, Ohnishi T: Downregulation of SPARC expression inhibits cell migration and invasion in malignant gliomas. *Int J Oncol* 34:707-715, 2009 査読有り

② 大西丘倫: 原発性脳腫瘍-悪性腫瘍. *Clinical Neuroscience* 27:455-457, 2009 査読無し

③ 原田広信, 大西丘倫: 脳浮腫. *Brain Nursing* 24 (2): 23-25, 2008 査読無し

④ 大上史朗, 大西丘倫: 脳腫瘍. *Modern Physician* 28 (5):692-697, 2008 査読無し

⑤ Fujiwara S, Nakagawa K, Harada H, Nagato S, Furukawa K, Teraoka M, Seno T, Oka K, Iwata S, Ohnishi T: Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int J Oncol* 30:793-802, 2007 査読有り

⑥ 大西丘倫: 脳腫瘍の病態と予後-脳の構造と機能. *がん看護実践シリーズ1 脳腫瘍* 野村和弘・平出朝子監修 渋井壮一郎編集 メヂカルフレンド社(東京) pp12-20, 2007 査読無し

[学会発表] (計 12 件)

① 井上明宏, 大西丘倫, 他: 膠芽腫における腫瘍幹細胞の同定とその特性の検討. 第 26 回日本脳腫瘍学会 2008. 12. 1, 松山

② 瀬野利太, 大西丘倫, 他: 悪性グリオーマの浸潤における SPARC の役割. 第 67 回日本脳神経外科学会総会 2008. 10. 2, 岩手

③ 井上明宏, 大西丘倫, 他: 神経膠芽腫における腫瘍幹細胞の同定とその特性の検討. 第 67 回日本脳神経外科学会総会 2008. 10. 1, 岩手

④ 原田広信, 大西丘倫, 他: 中枢神経系悪性リンパ腫における HD-MTX 時代の問題点. 第 67 回日本脳神経外科学会総会 2008. 10. 3, 岩手

⑤ 高野昌平, 大西丘倫, 他: 膠芽腫における methionine PET の意義-Met-PET を指標とした腫瘍摘出の可能性. 第 67 回日本脳神経外科学会総会 2008. 10. 3, 岩手

⑥ Ohnishi T: Inhibition of glioma invasion by silencing SPARC with siRNA. 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. 2008. 6. 9, Hakodate.

⑦ 井上明宏, 大西丘倫, 他: 脳腫瘍からの腫瘍幹細胞の分離、同定とその特性の検討. 第 26 回日本脳腫瘍病理学会. 2008. 5. 23, 東京

⑧ Ohnishi T: Recent progress in surgery of malignant brain tumor. World Federation of Neurosurgical Societies, 13th Interim Meeting /The 12th Asian-Australasian Congress of Neurological Surgeons. Nov 18, 2007, Nagoya.

⑨ 大西丘倫: 悪性脳腫瘍の手術的治療-最近の進歩. 第 32 回日本外科系連合学会学術集会 2007. 6. 22, 東京

⑩ 原田広信, 大西丘倫, 他: 再発グリオーマにおける SPARC 発現についての検討. 第 25 回日本脳腫瘍学会 2007. 12. 10, 東京

⑪ 瀬野利太, 大西丘倫, 他: SPARC に対す

る siRNA を用いたグリオーマの浸潤抑制.
第 25 回日本脳腫瘍学会 2007. 12. 10, 東京

⑫瀬野利太、大西丘倫、他:SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine)に対する siRNA を用いたグリオーマの浸潤抑制. 第 66 回日本脳神経外科学会総会 2007. 10. 6, 東京

[図書] (計 1 件)

①大上史朗、大西丘倫: 傍矢状洞髄膜腫.
新井一編集: NS NOW 3 テント上髄膜腫 アプローチから摘出まで. Medical View 社 (東京)、pp53-63, 2008

[その他]

Line (Local Intelligence News letter Ehime University) vol. 31 pp15-16 研究紹介, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 丘倫 (OHNISHI TAKANORI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70233210

(2) 研究分担者

原田 広信 (HARADA HIRONOBU)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20335897

(3) 連携研究者

なし