

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19790988
 研究課題名（和文）神経膠腫の腫瘍幹細胞維持機構の解明：低酸素環境の関与についての研究
 研究課題名（英文）The role of hypoxia in enhancing glioma stem cell population.
 研究代表者
 櫻田 香（SAKURADA KAORI）
 山形大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：60312732

研究成果の概要：神経膠腫において、ヒト悪性神経膠腫細胞において低酸素マーカーHIF-1 α 高発現域では幹細胞マーカーnestinの発現も高い傾向と、培養神経膠腫細胞において低酸素培養、もしくはHIF-1 α 分解阻害剤にてnestinの発現が上昇することが確認された。これらの結果から低酸素環境、Hif-1 α が腫瘍幹細胞の増殖・維持を促進させる可能性が示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研ひの分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：神経膠腫、腫瘍幹細胞、低酸素

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は成人脳腫瘍で最も頻度の高い疾患であるが、その治療成績はいまだ極めて不良である（5年生存率10%以下）。近年、腫瘍幹細胞仮説：Cancer Stem Cell theoryが提唱され、悪性神経膠腫においても腫瘍幹細胞が存在するという報告がなされている。低酸素環境の指標であるHIF-1の発現は神経膠腫の悪性度と相関があると報告され、また神経膠腫の中で最も悪性度の高いglioblastoma multiformeの特徴的な病理像であるnecrosisは低酸素環境の結果生じていると考えられることから、腫瘍内の低酸素

環境は治療抵抗性と密接に関わっている可能性が考えられる。ここで興味深いことに正常の神経幹細胞は低酸素環境において細胞数が増加することが報告されている。

2. 研究の目的

脳腫瘍幹細胞は神経幹細胞の性質を共有することが知られていることから、低酸素環境が神経幹細胞だけでなく脳腫瘍幹細胞の増殖に寄与していることが考えられる。これまで腫瘍幹細胞は、非幹細胞に比べ化学療法・放射線療法に高い抵抗性を示すことが報

告されている。

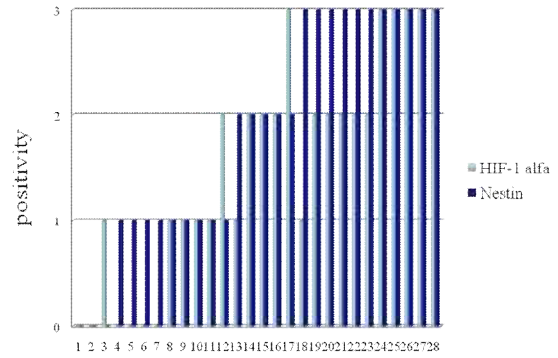
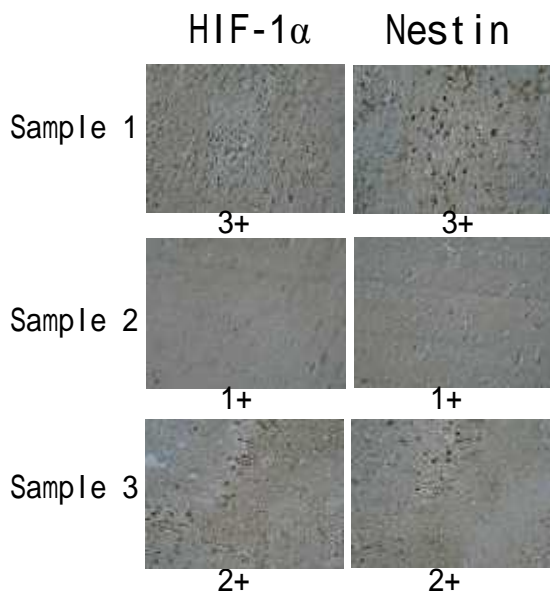
そこで今回「腫瘍内低酸素環境は、脳腫瘍幹細胞を増加させることにより悪性神経膠腫の治療抵抗性をもたらす」という仮説を着想し検討することとした。

3. 研究の方法

- 1) HIF-1 の発現と腫瘍幹細胞マーカーの一つである Nestin の発現の相関を、悪性神経膠腫手術摘出サンプルにて検討した。
- 2) 腫瘍摘出サンプルにおいて、腫瘍内の局在と HIF-1, Nestin, MIB-1 の陽性率の関係について検討した。
- 3) グリオーマ培養細胞を、低酸素チャンバ (Anero pack system, Mitsubishi gas co.) による低酸素培養及び HIF-1 分解阻害剤 CoCl₂ を用いて HIF-1 を化学的に増加させた chemical hypoxia にて実験を行った。これらの 2 条件で HIF-1 の上昇を確認後、HIF-1 阻害剤を用いて培養し、HIF-1 と腫瘍幹細胞マーカー nestin の発現を western blot にて検討した。

4. 研究成果

- 1) 悪性神経膠腫 28 サンプルのパラフィン固定サンプルを用いて、HIF-1 と nestin の発現を免疫組織学的に検討した。図 1、図 2 のごとく、HIF-1 が高率に陽性のサンプルで Nestin の陽性細胞を多く認めた。免疫染色にて、細胞の陽性率を 0 ~ 3+ の 4 段階に判定した。



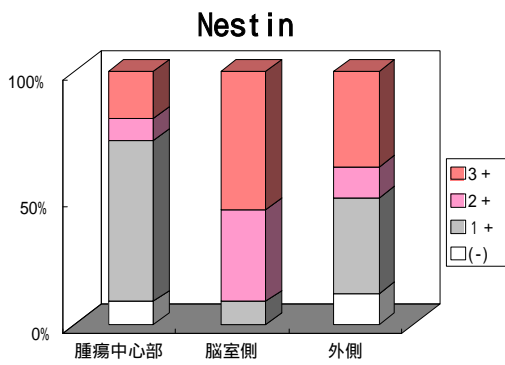
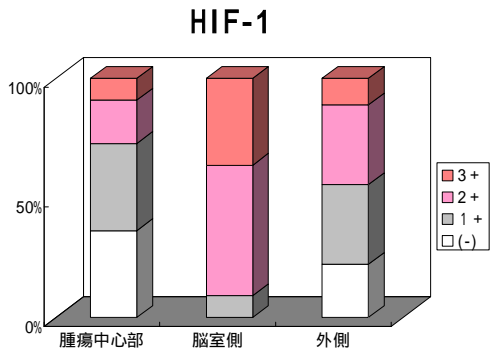
- 2) 臨床神経膠腫標本における HIF-1, nestin のタンパク質発現の検討。脳室近傍は生理的にも皮質に比べ低酸素環境であると考えられる。また正常神経幹細胞も脳室周囲に多く観察されるとの報告があることから、側脳室近傍に発生した。神経膠腫 11 例において、1) 脳室に近い部位、2) 腫瘍中心部、3) 脳室から遠い部分の 3 点で HIF-1 と Nestin の発現および MIB-1 labeling index を免疫染色で検討した (表 1)。

Case	IHC	腫瘍中心部	脳室側	腫瘍外側
1	HIF-1 α	3+	2+	n.e
	Nestin	3+	3+	n.e
	MIB-1 LI	7.8%	3.5%	n.e
2	HIF-1 α	2+	3+	n.e
	Nestin	3+	3+	n.e
	MIB-1 LI	10.2%	2.7%	n.e
3	HIF-1 α	2+	3+	—
	Nestin	2+	2+	—
	MIB-1 LI	3.6%	5.8%	3.5%
4	HIF-1 α	—	2+	n.e
	Nestin	1+	3+	n.e
	MIB-1 LI	18%	1%	n.e
5	HIF-1 α	—	2+	3+
	Nestin	1+	1+	3+
	MIB-1 LI	2.7%	11.5%	13%
6	HIF-1 α	1+	2+	1+
	Nestin	—	2+	3+
	MIB-1 LI	3.2%	4.9%	28%
7	HIF-1 α	—	2+	1+
	Nestin	1+	3+	3+
	MIB-1 LI	2.5%	28%	14%
8	HIF-1 α	1+	2+	1+
	Nestin	1+	2+	1+
	MIB-1 LI	3.5%	12%	11%
9	HIF-1 α	1+	1+	—
	Nestin	1+	2+	1+
	MIB-1 LI	2.3%	7.7%	8.6%
10	HIF-1 α	1+	3+	2+
	Nestin	1+	3+	2+
	MIB-1 LI	3.8%	9.2%	6.5%
11	HIF-1 α	—	3+	2+
	Nestin	—	3+	3+
	MIB-1 LI	1%	3.5%	2%

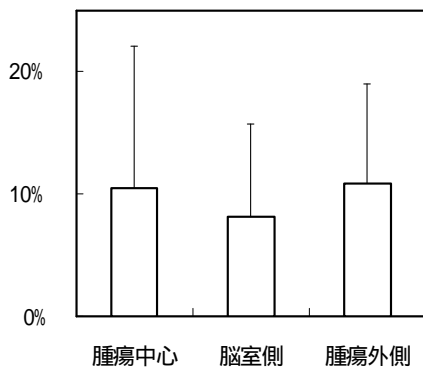
IHC: Immunohistochemistry

n.e : not examined

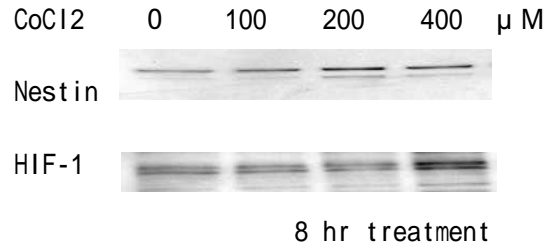
脳室近傍で、HIF-1 および Nestin の陽性細胞が高率に認められた (図 3)。



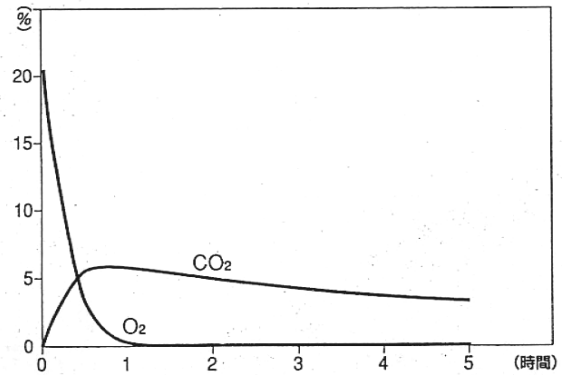
腫瘍の部位と MIB-1 labeling index との間には相関は認められなかった (図 4)。



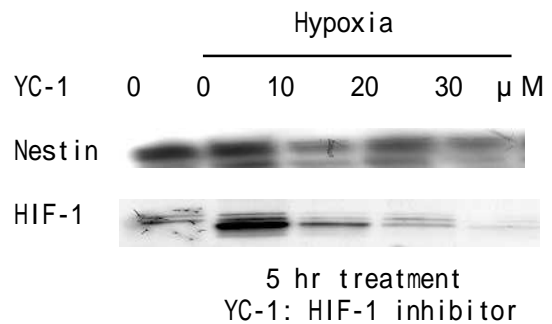
3) 神経膠腫細胞株 A172 を 10% FBS+DMDM 培地にて培養し、CoCl₂ を培地に加えて chemical hypoxia とした。CoCl₂ 処理後 8 時間で細胞を採取し lysate にした。この結果、CoCl₂ 濃度依存的に HIF-1 も Nestin 発現も上昇が western blot にて確認された。(図 5)



低酸素チャンバ[®]を用いて低酸素環境にて A172 細胞を培養した。本システム pack 内の酸素濃度グラフを示す (図 6)



低酸素培養 5 時間後 HIF-1 と nestin タンパク質の増加が western blot にて確認され、更にこの増加は HIF-1 の選択的阻害剤である YC-1 にて濃度依存的に抑制された。(図 7)



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0件)

[学会発表](計1件)

櫻田香、齋野真、毛利涉、佐藤篤、嘉山孝正：側脳室近傍悪性神経膠腫における腫瘍幹細胞・低酸素環境・増殖脳の検討．第25回日本脳腫瘍病理学会．2007年4月19日、熊本市

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻田 香 (SAKURADA KAORI)

山形大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60312732

(2)研究分担者

(3)連携研究者