

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390387

研究課題名（和文） 癌幹細胞分化誘導システムを利用した乏突起膠腫の分子マーカーの探索

研究課題名（英文） Identification of the novel molecular marker for oligodendroglial tumor using induced differentiation system against glioma stem cell.

研究代表者

竹島 秀雄（TAKESHIMA HIDEO）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70244134

研究成果の概要（和文）：悪性グリオーマは、予後の最も悪い悪性腫瘍であるが、グリオーマ幹細胞が重要な役割を担っていると考えられている。今回我々は、グリオーマ幹細胞を樹立し、N-myc downstream-related gene (NDRG) および EVI1 の解析を行った。1) NDRG は、幹細胞では発現がないが、分化誘導により発現する。2) EVI1 は中枢神経系の形成不全に関係するが、EVI1 を knock down すると幹細胞の維持に重要な Notch シグナル系の発現が抑制された。これら新たな知見は、癌幹細胞に対する新たな治療法の確立に向けて重要な基礎的所見と思われる。

研究成果の概要（英文）：Malignant gliomas show dismal prognosis and glioma stem cell may play a pivotal role on this issue. We established glioma stem cell lines from surgical samples using spheroid method. Using these glioma stem cells, we biologically analyzed 2 novel molecules, N-myc downstream-related gene (NDRG) and EVI1. (1) Glioma stem cell did not express NDRG. However, after differentiation in response to serum, glioma cell strongly express NDRG. (2) EVI1 is a transcriptional factor. Knock-out mice show abnormality in central nervous system. We have shown that knock-down of EVI1 in glioma stem cell and found that Notch signal transduction system was strongly suppressed. These novel findings might be important for establishing new treatment against malignant glioma.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：癌幹細胞、乏突起膠腫、分子マーカー、グリオーマ、分化誘導

## 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、固形腫瘍の中で最も予後の悪い悪性腫瘍の1つである。その理由として、1) 腫瘍が浸潤性格を有するため、明確な境界を持ち得ない、2) 脳自体に言語野・運動野など機能的に重要な領域があり、この

部に及んだ腫瘍は摘出が不可能である、などの手術に関する物理的要因に加え、3) 脳血液関門のため他臓器癌に有効な抗ガン剤の多くが腫瘍局所に達しない、4) 基本的に腫瘍細胞自体が放射線や化学療法に対して抵抗性があるなどの生物学的要因が加味され

る。ところが、近年悪性グリオーマの中にも化学療法や放射線療法に対して感受性が高く、長期予後が期待できるサブグループがあることが分かった。その代表が乏突起膠腫である。この腫瘍は当初 peri-nuclear halo 等の形態学的特徴をもとに分類されたものであるが、病理学的に悪性の所見を示しているにもかかわらず、他の悪性グリオーマと比較して長期生存する例が多いなど、特異的な臨床的サブグループを構成していることがわかってきた。さらに、基礎研究の集積により 70-90%の腫瘍において 1p, 19q の LOH を伴うということがわかってきた。すなわち分子レベルにおいても他の悪性グリオーマとは異なったプロファイルを持つことが明らかになった。また、この腫瘍の重要性が認識されると、混合型を含め実際には従来より考えられていた頻度より、かなり高い発生頻度で発生していることもわかってきた。

しかし、臨床における問題点として、その鑑別診断の中心は依然形態学的な域を出ず、多分に主観的な要素に左右される。この曖昧な要素を排除するためには、特異的マーカーの同定が必須となる。近年 OLIG2 がマーカーとして脚光を浴びた。感度は良好なものの、特異性に関しては十分ではない。これを受けて、最近我々は独自に ABCA2 というミエリンの能動輸送に関わる膜タンパク質が、乏突起膠腫の特異的マーカーになりうることを見だし報告した (Neurosurgery 2007)。特異性は OLIG2 より高いものの、それでも単独では依然満足行くものではない。従って、患者の治療を効率的に行うためには、今後さらに特異性の高い分子マーカーの発見が切望される。

最近腫瘍の形成において cancer stem cell の存在がクローズアップされている。すべての腫瘍は自己複製能を持つ幹細胞の癌化によるとする仮説である。非常に興味深いことに悪性星細胞腫と乏突起膠腫が混在した腫瘍をしばしば認める。これは、別々の腫瘍が同時に発生したわけではなく、一つの cancer stem cell が同時に多方向に分化した結果発生した可能性が高い。また、臨床病理学的には、乏突起膠腫と星細胞腫の成分を同時に有する混合型腫瘍や、膠芽腫 (GBM) の一部に乏突起膠腫 a への分化を示唆する腫瘍の存在も知られており、脳における幹・前駆細胞を発生母地とした発癌プロセスの可能性が示唆されている。通常は、臨床サンプルから subtraction 法や micro-array 等を用いて遺伝子の発現プロファイルと比較していくが、この方法だと正常細胞の混入 (浸潤した白血球や血管内皮) の影響を受けたり、個体差による発現レベルのバリエーションなどの影響に左右されやすく、真の特異的発現遺伝子

の他に数多くの false positive な遺伝子群が検出されるため、解析が困難となることになる。従って、このことを回避するためにはより純化した細胞レベルで比較することが有用となる。すなわち、stem cell を単離して、これを双方向に分化させることで、通常の組織のコンタミネーションに煩わされず、純化した双方の腫瘍の遺伝子プロファイルと比較することが可能と思われる。

## 2. 研究の目的

まず、臨床の現場に即して新たな乏突起膠腫の特異的マーカーを探索する。そのために、星細胞腫と乏突起膠腫の混合腫瘍より採取し、培養・確立した cancer stem cell を出発点にサイトカイン刺激により星細胞系と乏突起細胞系に分化を誘発し、両者の遺伝子プロファイルを詳細に比較検討する。

次に、この結果をもとに星細胞腫と乏突起膠腫の生物学的な差異において、エピジェネティックなメカニズムが如何に関与しているかを明らかにする。

また、乏突起膠腫における腫瘍免疫について解析する。

また、乏突起膠腫では、その血管構造は chicken-wire と呼ばれる特徴的な形態を取る。血管内皮は腫瘍細胞ではないため、腫瘍の産生分泌するサイトカインなどの因子によって引き起こされる現象であり、星細胞腫系とは明らかにことなる因子が作用していると思われる。この点に関してもその分子生物学的メカニズムをもとに明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 術中腫瘍組織の採取および Cancer stem cell の細胞株の確立

手術摘出腫瘍より astrocytoma と乏突起膠腫の成分の混在する腫瘍を選定し、特定の培養条件下\* (無血清培地下で bFGF +PDGF の環境) に stem cell を確立する。

確立した stem cell にこれまでに、正常の神経幹細胞で乏突起膠腫への分化を誘導する bFGF や PDGF などのサイトカインを添加して、乏突起膠腫の表現型に分化を試みる。

### (2) NDRG2 の発現と患者予後との相関

神経膠腫の手術摘出標本 34 例 (grade II 4 例、grade III 10 例、grade IV 20 例) から RT-PCR および免疫組織化学的に NDRG2 の発現を解析した。このデータをもとに、Grade IV において生存解析を行った。

さらに、(1) で確立したグリオーマ幹細胞を FBS 添加により分化誘導させ、NDRG2 の発現の変化を RT-PCR、蛍光抗体法で解析した。

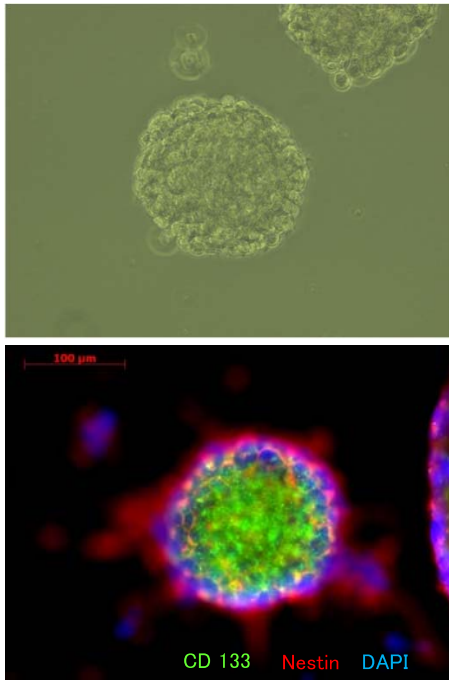
### (3) グリオーマ幹細胞での EVI1 の役割

樹立したグリオーマ幹細胞に対して shEVI1

を遺伝子導入した安定発現株を作成した。Notch シグナルの下流の遺伝子変化を real time PCR で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) グリオーマ幹細胞培養系の確立  
スフェロイド法により図の如くグリオーマ摘出組織よりグリオーマ幹細胞の培養系を確立した。Immunocytochemistry により細胞は未分化な細胞での発現が報告されている CD133, nestin を発現していることを確認した。



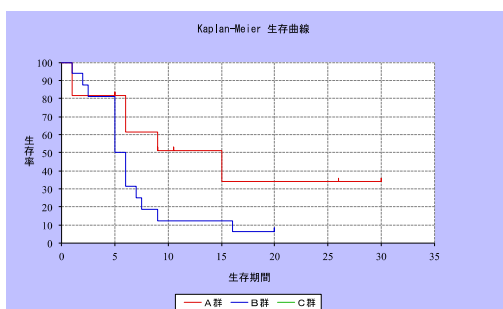
(2) NDRG2 の発現と患者予後との相関

#### NDRG2 Grade別発現頻度

real time PCRにて評価 (cut off:0.5)

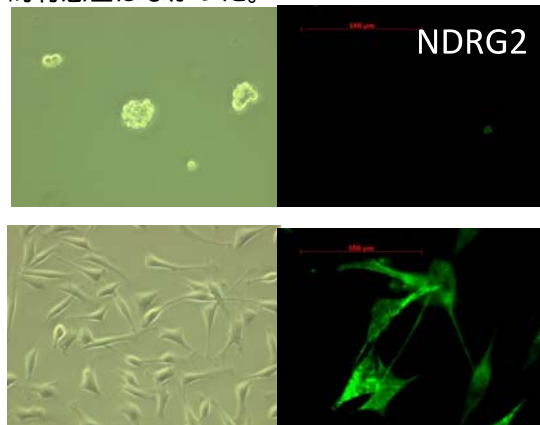
	NDRG2 +	NDRG2 -	n
Grade IV	13 (43%)	17 (57%)	30
Grade III	7 (70%)	3 (30%)	10
Grade II	6 (86%)	1 (14%)	7
total	26 (55%)	21 (45%)	47

#### NDRG2とPFS GBM



A: NDRG2 + (11)  
B: NDRG2 - (16)

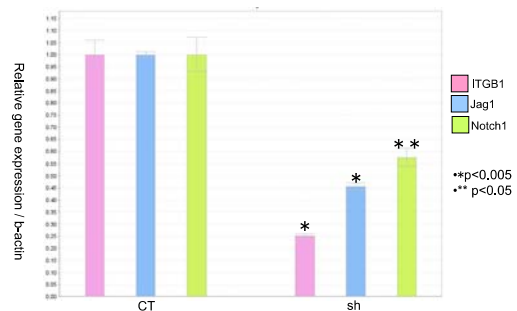
神経膠腫の手術摘出標本 34 例 (grade II 4 例、grade III 10 例、grade IV 20 例) を real time PCR により解析したところ、NDRG2 の発現は、より悪性度の高いグリオーマにおいて発現している割合が低下した。そこで、Grade IV のみの症例に注目して、生存解析を Kaplan-Meier により行ったところ、図に示す如く、NDRG2 の発現の有無で生存期間の差を認めた。ただし、症例数が少ないため統計学的有意差はなかった。



また、当教室で樹立したグリオーマ幹細胞に血清を添加することで分化を誘導すると、上図の右のパネルに示すように、NDRG2 の発現が見られるようになった。このことは NDRG2 の発現のないものは、より未分化な腫瘍成分を含有しており、治療に対する抵抗性と相関している可能性を示唆し、新たな治療ターゲットとなりうると考えられた。

(3) グリオーマ幹細胞での EVI1 の役割

#### Knockdown of EVI1 represses ITGB1, Jag1 and Notch1 gene expression



H23.1.21 Realtime PCR 用 cDNA kit 133-CT vs sh EVI1  
Delta CT 法 call to cDNA kit: -20degree human primer 2 box

shEVI1 を遺伝子導入した安定発現株において、Notch シグナルの発現の変化を real time PCR で解析した。Jag1, Notch1 の遺伝子発現の抑制が確認された。

#### 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3件)

Fukushima T, Takehima H, Kataoka H. Anti-glioma therapy with temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT. Anticancer Res 29: 4845-4854, 2009

Sato S, Sato Y, Marutsuka K, Takehima H, Asada Y. Characteristics of tumour vessels in cytological squash smears of astrocytic tumours. Cytopathology 2010, in press

松元文孝、山下真治、杉本哲朗、盛口清香、鮫島直樹、丸塚浩助、横上聖貴、上原久生、竹島秀雄：異型性脳室外神経細胞腫の1例. 脳神経外科速報, Vol. 20(9), 1060-1065, 2010

〔学会発表〕(計8件)

横上聖貴、上原久生、武石 剛、山下真治、池田俊勝、竹島秀雄：人脳腫瘍サンプルと市販脳腫瘍細胞株からの cancer stem-like cell (CSC) line の樹立と性格. 第10回日本分子脳神経外科学会, 岡山 2009

横上聖貴、上原久生、武石 剛、山下真治、池田俊勝、竹島秀雄：ヒト脳腫瘍 sample からの cancer stem-like cell (CSC) line の樹立. 第27回日本脳腫瘍学会, 大阪 2009

Takeishi G, Yokogami K, Ikeda T, Yamashita S, Uehara H, Takeshima H: Establishment of stem-like cell of central neurocytoma. The 7<sup>th</sup> Meeting of asian society for neuro-oncology, Seoul, Korea 2010

Ikeda T, Yokogami K, Yamashita S, Takeishi G, Uehara H, Takeshima H: P13K but no TGF-beta regulates dedifferentiation and proliferation of glioma cells The 7<sup>th</sup> Meeting of asian society for neuro-oncology, Seoul, Korea 2010

池田俊勝、横上聖貴、山下真治、武石 剛、上原久生、竹島秀雄：グリオーマ細胞の脱分化、増殖における P13K と TGF-beta の役割. 第11回日本分子脳神経外科学会, 仙台 2010

横上聖貴、武石 剛、池田俊勝、山下真治、上原久生、竹島秀雄：中枢神経細胞腫における初代培養の試み. 第11回日本分子脳神経外科学会, 仙台 2010

武石 剛、横上 聖貴、池田 俊勝、山下 真治、上原 久生、竹島 秀雄：中枢神経細胞腫における初代培養の試み.

日本脳神経外科学会第 69 回学術総会, 福岡 2010

池田俊勝、横上聖貴、山下真治、武石 剛、上原久生、竹島秀雄：グリオーマ細胞の脱分化、増殖における P13K と TGF-beta の役割. 日本脳神経外科学会第 69 回学術総会, 福岡 2010

〔図書〕(計1件)

竹島秀雄 中枢神経系腫瘍 in 入門腫瘍内科学 日本臨床腫瘍学会監修 pp222-224, 篠原出版新社、東京 2009

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹島 秀雄 (TAKESHIMA HIDEO)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号：70244137

(2) 研究分担者

上原 久生 (UEHARA HISAO)  
宮崎大学・医学部・准教授  
研究者番号：80203470

横上 聖貴 (YOKOGAMI KIYOTAKA)  
宮崎大学・医学部・講師  
研究者番号：40284856

山下 真治 (YAMASHITA SHINJI)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号：40468046

(3)連携研究者

研究者番号：