

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791013

研究課題名（和文）

神経作動薬を用いた脳腫瘍幹細胞ターゲット療法の開発

研究課題名（英文）

Exploitation of brain tumor stem cell targeted therapy using neurotransmitters

研究代表者

吉川 功一 (YOSHIKAWA KOICHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50379955

研究成果の概要（和文）：

脳腫瘍において脳腫瘍幹細胞 (BTSC) が脳腫瘍形成・維持のソースとなっている。本研究では臨床サンプルより BTSC 株を複数樹立し、各種神経作動薬 (apomorphine, PAPP, ifenprodil, indatraline, sertraline, tegaserod) の BTSC 殺細胞効果を確認した。また蛍光色素である 5-aminolevulinic acid を用いた BTSC を標的とした光線力学療法の効果についても確認した。これらの結果は究極の脳腫瘍治療である BTSC 標的治療の開発に向け大きな礎となる。

研究成果の概要（英文）：

Brain tumor stem cell (BTSC) play a role of source cell to form and maintain the brain tumor mass. In this study, we successfully established the BTSC cell lines and showed the anti-tumor effect of neurotransmitters as apomorphine, PAPP, ifenprodil, indatraline, sertraline, tegaserod on BTSC. In addition, we showed the anti-tumor effect on BTSC using photodynamic therapy technique using 5-aminolevulinic acid. These results become the cornerstone for development of BTSC target therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総 計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：脳腫瘍、グリオーマ、脳腫瘍幹細胞、神経作動薬、ターゲット療法

1. 研究開始当初の背景

研究開始時点で、多彩な phenotype を示す集合体である腫瘍塊の中には cancer

stem cell が少数存在し、腫瘍形成・維持に深く関わっているとする癌幹細胞学説が提唱され、腫瘍研究の topic となりつつあった。脳腫瘍においても

脳腫瘍幹細胞 BTSC が同定され、脳腫瘍形成・維持のソースとなっていることが証明された (Singh S et al. Nature 432: 396-401, 2004)。神経幹細胞マーカーである CD133 を発現する BTSC は、自己複製能および多分化能を持つ。BTSC 自身が自己複製して腫瘍のソースとして維持されつつ、一部は分化腫瘍細胞へ分化し、全体として heterogenous な phenotype を持つ腫瘍塊を形成する。BTSC としての機能を失った分化腫瘍細胞 (CD133-) は腫瘍形成能を失う。BTSC は放射線化学療法に強い耐性を持つため (Piccirillo SGM et al. Nature 444: 761-765)、通常 BTSC は残存し再発が起こる。つまり癌幹細胞学説に基づけば、腫瘍の根源である BTSC を駆逐する脳腫瘍幹細胞ターゲット療法こそが究極の治療法であるが、その具体的方法は未だ報告されていなかった。しかし BTSC 自己複製抑制、強制的 BTSC 分化誘導が可能となれば、脳腫瘍幹細胞ターゲット療法の強力な手段となりうると考えられた。一方、神経作動薬である apomorphine、PAPP、ifenprodil が、正常神経幹細胞の自己複製抑制および分化誘導効果をもつことが報告された (Diamandis P et al. Nat Chem Biol 5:268-273, 2007)。これを受けて我々は脳腫瘍幹細胞に対しても同様の効果を持つか否か実験を行ない、これら薬剤が in vitro レベルで BTSC 自己複製抑制効果、強制的 BTSC 分化誘導効果を持つことを確認しつつあった。また申請者である吉川は本実験を行なうために、世界に先駆けて高純度脳腫瘍幹細胞長期培養システム (tumor NS cell culture 法) を開発した (Cell Stem Cell 4(6):568-80, 2009)。本実験を行なう上で、BTSC を安定的に高純度かつ未分化状態で培養するシステムが必要であるが、一般に BTSC 培養に用いられている neurosphere 法では、長期培養すると CD133 陽性率が低下し、分化細胞が高頻度に混入してくる欠点がある。Tumor NS cell culture 法はこの欠点を克服するために新たに開発した新規培養法 (単層接着培養) である。本法で樹立した BTSC 細胞株は CD133 陽性率 99.8% と非常に純粋な BTSC 状態を保ったまま 1 年以上長期継代可能で、多分化能も保たれていた。NOD/SCID マウス脳への少数細胞 (1000

個) 移植実験において強い腫瘍形成能を持ち、かつサンプルとなった患者の組織像を完全に模倣する腫瘍であることも確認された。本研究では本培養法を用いてヒト脳腫瘍幹細胞株を複数樹立し使用する予定で、BTSC 特異的でより信頼性の高い結果を得ることができると考えられた。

2. 研究の目的

神経作動薬である apomorphine、PAPP、ifenprodil の薬剤効果をなるべく多くのヒト脳腫瘍サンプルを用いてより詳細に検討すること、更にその他の薬剤での脳腫瘍幹細胞標的治療の可能性を探ることを目的とした。その結果、脳腫瘍幹細胞ターゲット療法の確立に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

本実験では手術で摘出したヒト悪性神経膠腫をサンプルとして用い、新規培養システム (tumor NS cell culture 法) を用いて複数の BTSC (脳腫瘍幹細胞) 株の樹立を行なう。薬物治療実験に先立って樹立された細胞株が in vitro、in vivo において BTSC としての特性を持っていることを確認する。続いて in vitro において各薬剤 (apomorphine、PAPP、ifenprodil) の抗腫瘍効果である BTSC 自己増殖能抑制効果を検証する。また上記薬剤以外にも脳腫瘍幹細胞標的療法に使用できる薬剤を検索する。具体的候補として 5-aminolevulinic acid (5-ALA) を用いた光線力学療法の可能性につき検証する。

(1) ヒト悪性神経膠腫サンプルから脳腫瘍幹細胞 (BTSC) 細胞株の樹立

悪性神経膠腫の手術標本から酵素処理により single cell suspension を得る。これらを EGF, FGF, LIF 添加 (血清非添加) 培養液にて一旦 neurosphere 培養した後、adhesion monolayer cell culture へ移行し培養を継続する。最低 15 passage まで継代培養を行い、細胞株樹立とする。EGF, FGF, LIF 添加 (血清非添加) 培養液を一貫して用いることで、BTSC のみが選択的に濃縮培養される。細胞株は複数樹立する。

(2) 細胞株の BTSC としての特性評価

各細胞株の CD133 陽性率を flow cytometry にて確認する。Matrigel コート glass

coverslip 上で培養・免疫染色を行い、他の幹細胞マーカー(musashi, nestin)についても定量的に確認する。Coverslip 上で分化誘導培養(各種分化誘導因子使用)を行い、多分化能を免疫染色で定量的に確認する。分化誘導による CD133 陰性化も flowcytometry にて確認する。樹立された細胞株を免疫不全マウス(NOD/SCID)脳に定位的移植し、腫瘍形成能を確認する。また移植細胞数を in vivo LDA assay にて腫瘍形成能の強さを確認する。得られた xenograft において、組織診断(HE 染色, サンプル患者組織との比較)、ヒト特異的抗体(human nuclei 抗体)と各種マーカー抗体(CD133, nestin, GFAP, TuJ1, CNPase)での 2 重染色による phenotype 確認を行なう。以上の実験により複数サンプル由来の BTSC 細胞株および脳腫瘍マウスモデルを完成する。

(3) Apomorphine, PAPP, ifenprodil の in vitro における BTSC 抑制作用の検証

樹立された BTSC 細胞株に対して in vitro で apomorphine, PAPP, ifenprodil で処理を行い、効果判定には time-lapse imaging を用いた live-cell imaging screening 法を用いる。

(4) 5-ALA による光線力学療法 (PDT) の試み
蛍光色素である 5-aminolevulinic acid (5-ALA)を用いた光線力学療法 (PDT) の可能性を見るべくグリオーマ幹細胞における 5-ALA 代謝、PpIX (protoporphyrin) 排泄能の評価を flowcytometry を用いて行う。具体的にはグリオーマ幹細胞における 5-ALA による PpIX 発光を flowcytometry を用いて定量的に計測する。さらにグリオーマ幹細胞に対し、5-ALA を添加したのち、laser を用いて photodynamic therapy (PDT) による in vitro での治療実験も行う。この時、殺細胞効果は MTT assay にて評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト悪性神経膠腫サンプルから脳腫瘍幹細胞 (BTSC) 細胞株の樹立

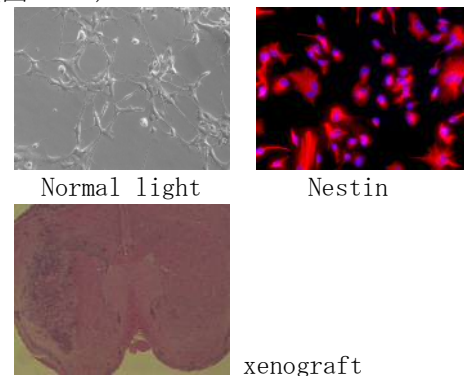
株化を試みた脳腫瘍(グリオーマ) 16 サンプルのうち 11 サンプル(成功率 69%)で脳腫瘍幹細胞株樹立を達成した(G144, G179, G166, Y02, Y03, Y04, Y05, Y06, Y07, Y09, Y10)。いずれも当初の計画どおりのプロトコルで樹立をおこない成功したもので、本研究で行っている新規培養法の有用性が確認された。また研究試料提供患者に対しては主治医からインフォームドコンセント

を十分行い、本実験の趣旨・目的、治療上患者の不利益となることがないこと、承諾後であっても希望があれば試料提供を撤回できること、患者個人情報に関して公になることはしないことを明記した承諾書に本人の直筆サインをもらった。

(2) 細胞株の BTSC としての特性評価

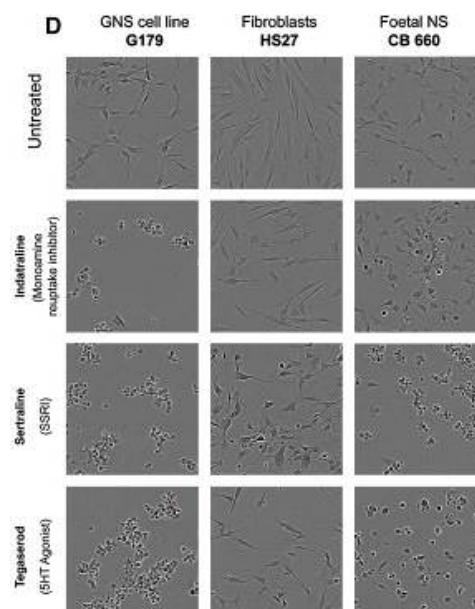
樹立した全ての細胞株で、脳腫瘍幹細胞としての特性評価を終了した。いずれの株も Nestin, Sox2 といった神経幹細胞マーカーを強く発現かつ CD133 陽性細胞を含み、かつ分化マーカーである GFAP, TuJ1, CNPase の発現はほとんど認められなかった。これらの細胞株のうち 6 細胞株を免疫不全マウス(NOD/SCID)脳に定位的移植し、腫瘍形成能を確認中したところ、少数の細胞移植で脳腫瘍 xenograft 作成に成功した。このことより治療実験に向けた材料として申し分のない脳腫瘍幹細胞株であることが確認できた。

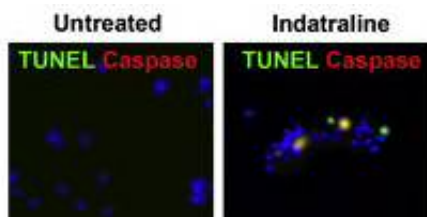
(図: Y10)



(3) グリオーマ幹細胞特異的抗腫瘍効果を持つ薬剤のスクリーニング

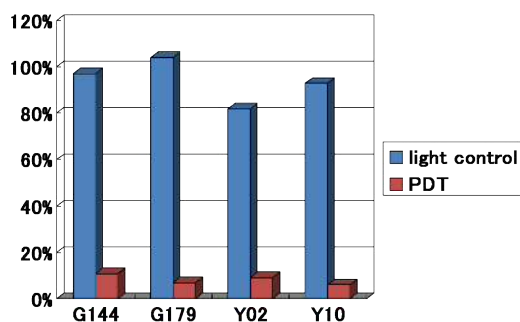
当初候補薬剤として挙げていた apomorphine, PAPP, ifenprodil を用いて in vitro での殺細胞効果検証実験を行った。細胞株として G179 (我々の樹立した細胞株)を用いた。評価には time-lapse imaging を用いた





live-cell imaging screening 法を用いた。当初候補薬剤として挙げていた apomorphine, PAPP, ifenprodil も含む 480 種類の薬剤を網羅的に用いた薬剤スクリーニングを行い in vitro での抗腫瘍効果の効果判定を行ったところ、apomorphine, PAPP, ifenprodil のみならず indatraline, sertraline, tegaserod などの神経作動薬においてもグリオーマ幹細胞特異的抗腫瘍効果が確認された(図)。その抗腫瘍効果は TUNEL 染色により apoptosis を介した効果であることを確認した(図)。これら一連の実験により本研究の目的である神経作動薬がグリオーマ幹細胞に対して特異的な抗腫瘍効果を持つことを実証した。

(4) 5-ALA による光線力学療法 (PDT) の試み
5-ALA (蛍光色素) を用いた光線力学療法 (PDT) の可能性を見るべくグリオーマ幹細胞における 5-ALA 代謝、PpIX(protoporphyrin) 排泄能の評価を flowcytometry を用いて行い、グリオーマ幹細胞における PpIX 排泄能低下を発見した。この結果に基づいて PDT 実験を行い、使用した全ての細胞株で PDT による殺細胞効果を確認した(図 MTT assay; G144, G179, Y02, Y10)。この結果、グリオーマ幹細胞に対する治療戦略として 5-ALA を用いた PDT も有用な治療ツールとなりうることが実証された。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

① 貞廣浩和、吉川功一、森尚昌、出口誠、梶原浩司、鈴木倫保. グリオーマ幹細胞における PpIX 排泄能の検討 第 28 回脳腫瘍学会 2010. 11. 28 軽井沢

② 貞廣浩和、吉川功一、森尚昌、出口誠、梶原浩司、鈴木倫保. グリオーマ幹細胞における PpIX 排泄能の検討 第 31 回レーザー医学会 2010. 11. 14 名古屋

③ 貞廣浩和、吉川功一、森尚昌、出口誠、梶原浩司、鈴木倫保. グリオーマ幹細胞における PpIX 排泄能の検討 第 69 回脳神経外科総会 2010. 10. 27 東京

④ 貞廣浩和、吉川功一、森尚昌、出口誠、梶原浩司、鈴木倫保. グリオーマ幹細胞における PpIX 排泄能の検討 第 11 回分子脳神経外科学会 2010. 8. 28 仙台

⑤ 貞廣浩和、吉川功一、森尚昌、出口誠、梶原浩司、鈴木倫保. グリオーマ幹細胞における PpIX 排泄能の検討 第 6 回脳神経外科光線力学研究会 2010. 6. 13 福井

⑥ 貞廣浩和 吉川功一 出口誠 吉野弘子 梶原浩司 鈴木倫保. 脳腫瘍幹細胞株の作成および長期安定培養について 第 113 回山口医学会 2010. 2. 20 山口

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 功一 (YOSHIKAWA KOICHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50379955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし