

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659339

研究課題名（和文） Rho/mDia シグナルを用いた脳腫瘍幹細胞のエピジェネティクス制御への挑戦

研究課題名（英文） Epigenetic regulation of glioma stem cell by using rho/mDia signaling

研究代表者

荒川 芳輝（ARAKAWA YOSHIKI）

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20378649

研究成果の概要（和文）：

腫瘍幹細胞は特殊な微小環境（ニッチェ、niche）に存在し、細胞環境に応答し分化制御のメカニズムを起動する。細胞形態で活性化状態を変化する低分子Gタンパク Rho に着目して脳腫瘍幹細胞のエピジェネティクス制御に関する解析を行った。樹立したグリオーマ腫瘍幹細胞に Rho シグナルを操作することで、腫瘍幹細胞の分化誘導に Rho シグナルの制御機構が認められた。これらの結果は腫瘍幹細胞におけるエピジェネティクス制御に Rho/mDia シグナルが関与することを示唆する。

研究成果の概要（英文）：

Cancer stem cells (CSC) reside in the specialized microenvironment “niche” and the cell differentiation of CSC is regulated in response to microenvironment changes. We studied the epigenetic regulation of glioma stem cell by using Rho/mDia signaling. By using inhibitors for Rho signaling, we found that rho signaling is involved in induction of differentiation of CSC. Our findings support that Rho/mDia signaling plays an important role in epigenetic regulation of CSC.

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,200,000	-	1,200,000
22 年度	1,000,000	-	1,000,000
23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

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：悪性神経膠腫 バイオイメーjing 腫瘍幹細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

腫瘍幹細胞は特殊な微小環境（ニッチェ、niche）に存在し、細胞環境依存して分化メカニズムを起動する。細胞環境で変化する細胞内シグナルは多数存在するが、低分子Gタンパク Rho は細胞接着で大きく活性化状態を変化し、さまざまな細胞内シグナルに関与する。特に、Rho の下流分子 mDia は細胞間接着、細胞基質間接着からのシグナル伝達で重要な役割を担う。このため、グリオーマ腫瘍幹細胞でエピジェネティックな転写活性を Rho/mDia シグナルが制御する可能性がある。

2. 研究の目的

腫瘍幹細胞のニッチェは治療前後で大きく変化する。患者膠芽腫切除標本を用いて治療前後の腫瘍幹細胞について解析した。次に低分子Gタンパク Rho に注目した解析を実施した。脳腫瘍幹細胞のエピジェネティクス転換・分化誘導メカニズムを細胞内シグナルから解析を進め、Rho/mDia シグナル操作による脳腫瘍幹細胞の分化誘導を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

- ① 膠芽腫切除サンプルから腫瘍幹細胞株の樹立を行った。樹立した細胞株を用いて *in vitro*、*in vivo* で分化誘導を行い腫瘍組織形成、形態変化について解析を行った。腫瘍幹細胞に各種阻害薬を用いてエピジェネティック制御機構の解析を行った。
- ② 膠芽腫切除標本の RNA 抽出、免疫染色を用いて腫瘍幹細胞の細胞シグナルについて解析を行った。
- ③ CD133 プロモーターを単離し、腫瘍幹細胞特異的発現の可能性を解析した。それぞれのプロモーターで発現する GFP、mCherry のレポーターベクターの作成を試みた。

4. 研究成果

- ① 膠芽腫切除サンプルから腫瘍幹細胞株を樹立し、*in vitro*、*in vivo* で分化誘導を行い、腫瘍組織形成能を確認した（図1）。

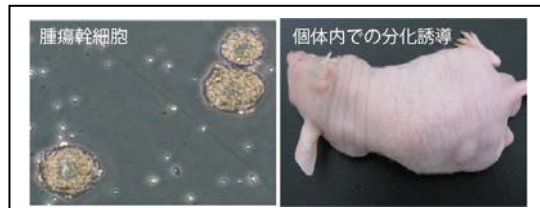


図1. 膠芽腫切除サンプルから腫瘍幹細胞を樹立し、個体内での分化誘導、腫瘍形成能を確認した。

グリオーマ腫瘍幹細胞に Rho 阻害剤 C3、ROCK 阻害薬 Y-27632 投与、Rho、mDia の活性型発現を行い、腫瘍幹細胞の分化誘導に Rho シグナルの関与があることが確認された。

- ② 膠芽腫切除標本の RNA 抽出、免疫染色を用いて解析を行い、再発病変では幹細胞マーカーの増加、発現細胞の増加が確認された（図2、3）。

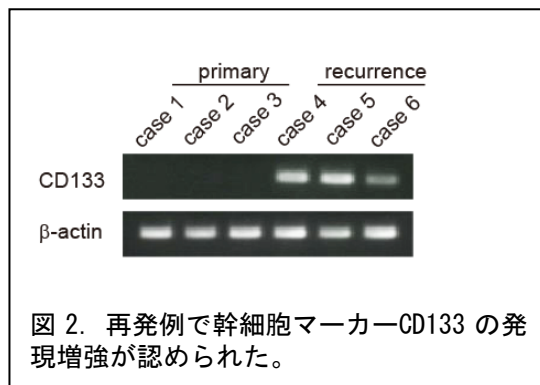


図2. 再発例で幹細胞マーカーCD133の発現増強が認められた。

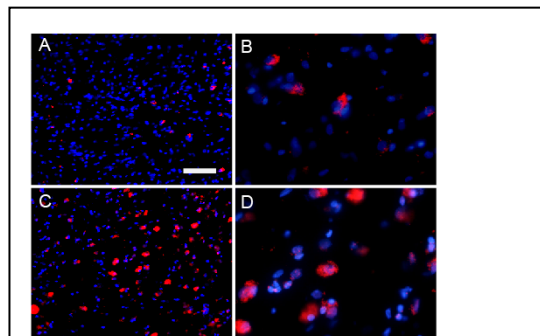


図3. 初発例(A, B)に比較し、再発例(C, D)で幹細胞マーカーCD133の発現細胞の増加が認められた。

RNA 解析から再発例で幹細胞マーカーの発現増強があり、免疫染色で再発組織に腫瘍幹細胞の増加が確認された。これは、ニッチェ環境が腫瘍幹細胞により有利な方向へ変化している可能性が示唆された。また、幹細胞マーカーと患者予後の関係があることが示唆された（図3）。

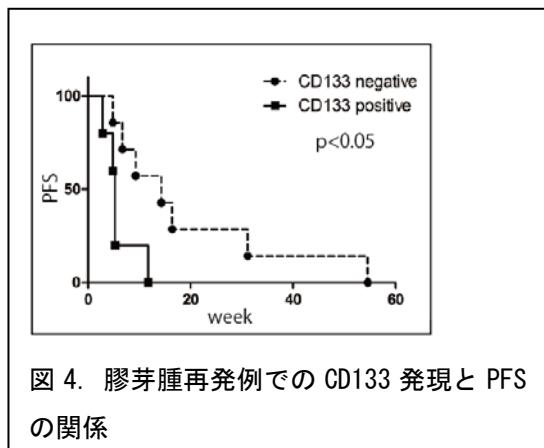


図 4. 膠芽腫再発例での CD133 発現と PFS の関係

③ CD133 プロモーターを単離し、CD133 プロモーターで発現制御される GFP (緑) レポーターベクターの作成を試みたが、脳腫瘍幹細胞特異的な発現制御が困難であることが明らかとなった。そこで新たな候補プロモーターの単離を進めている。

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 3 件)

1. Eishu Hirata, Hiroko Yukinaga, Yuji Kamioka, Yoshiki Arakawa, Susumu Miyamoto, Takaharu Okada, Erik Sahai, and Michiyuki Matsuda. In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *Journal of Cell Science*, 2012. 査読あり doi: 10.1242/jcs.089995
2. João V. Cordeiro, Susana Guerra, Yoshiki Arakawa, Mark P. Dodding, Mariano Esteban, Michael Way. F11-mediated inhibition of RhoA signalling enhances the spread of vaccinia virus in vitro and in vivo in an intranasal mouse model of infection. *PLoS One* 4(12):e8506, 2009 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0008506
3. Eishu Hirata, Yoshiki Arakawa, Mitsuaki Shirahata, Makoto Yamaguchi, Yo Kishi, Takashi Okada, Jun A Takahashi, Michiyuki Matsuda, and Nobuo Hashimoto. Endogenous Tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of the

surrounding brain tissue. *Cancer Science*, 100(8):1451-9, 2009. 査読あり

doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01189.x. *Cancer Sci*

[学会発表] (計 10 件)

1. 荒川芳輝、溝脇尚志、小倉健吾、北条雅人、高木康志、高橋淳、三國信啓、平岡眞寛、宮本享 最新技術を駆使した Glioblastoma に対する集学的治療と機能温存・改善のための今後の展望 日本脳神経外科学会 第 70 回学術総会 2011/10/14 横浜
2. 村田大樹、荒川芳輝、山口真、平田英周、宮本享 sunitinib によるワクシニアウイルス療法を増強効果の解析 第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会、2011/11/28 岐阜
3. 平田英周、幸長弘子、荒川芳輝、宮本享、松田道行 Rho-family GTPase によるグリオブラストーマ浸潤制御 第 28 回日本脳腫瘍学会、2010/11/28 長野
4. 山口真、荒川芳輝、平田英周、山口真、鐘本学、白畑充章、荒川芳輝、宮本享 ワクシニアウイルス及び分子標的薬を併用した悪性グリオーマに対する新規治療法の開発 第 28 回日本脳腫瘍学会、2010/11/28 長野
5. 荒川芳輝、平田英周、宮本享、松田道行 二光子励起蛍光顕微鏡による glioblastoma 浸潤機構の in vivo 解析 第 28 回日本脳腫瘍病理学会、2010/5/21 日 大阪
6. Eishu Hirata, Hiroko Yukinaga, Yuji Kamioka, Yoshiki Arakawa, Susumu Miyamoto, Michiyuki Matsuda. Two modes of glioblastoma invasion as visualized by two-photon excitation microscopy. AACR/JCA Joint Conference 2010/2/5-9, Hawaii
7. 山口真、荒川芳輝、岡田崇志、鐘本学、白畑充章、岸陽、宮本享 悪性グリオーマに対するワクシニアウイルスを用いた新規治療法開発 第 68 回日本脳神経外科学会 2009/10/16 東京
8. 平田英周、荒川芳輝、松田道行 Analysis of glioblastoma invasion by

two-photon excitation fluorescence
microscopy and FRET microscopy 第 68
回日本癌学会学術総会 2009/10/1-3
神奈川

9. 平田英周、**荒川芳輝**、宮本享、松田道行
2 光子励起蛍光顕微鏡及び FRET
imaging を用いたグリオブラストーマ
浸潤機構の解析. 第 27 回日本脳腫瘍学
会、2009/11/9 大阪
10. 山口真、**荒川芳輝**、岡田崇志、鐘本学、
白畑充章、岸陽、宮本享 悪性グリオ
ーマに対するワクシニアウイルスを用い
た新規治療法開発 第 27 回日本脳腫瘍
学会、2009/11/8 大阪

[その他]

ホームページ等

<http://neurosur.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 芳輝 (ARAKAWA YOSHIKI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20378649