様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年３月３１日現在

機関番号：１６３０１
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2009～2010
課題番号：21791366
研究課題名（和文）　グリオブラストーマ治療抵抗性における腫瘍幹細胞の関与と幹細胞性維持機構の解明
研究課題名（英文）　Involvement of cancer stem cells in the failure of curative treatment

研究代表者
高橋　寿明（TAKAHASHI　HISAAKI）
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20363228

研究成果の概要（和文）：
悪性グリオーマにわずかに存在する腫瘍幹細胞が新たな治療ターゲットとして注目されている。一方、悪性グリオーマの高い浸潤能が治療抵抗性の最大要因であるものの、腫瘍幹細胞との関係は明らかでない。そこで、ヒト悪性グリオーマ細胞から腫瘍幹細胞の分離を行い、浸潤能を検討した。グリオーマ幹細胞は親株細胞に比べて in vitro、in vivo おいて強い浸潤能を示し､その強い浸潤能にはマトリックスメタロプロテアーゼ 13 が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：
Glioblastoma has been shown to contain a small population of cancer stem cells. Recent studies have suggested that cancer stem cells cause tumor recurrence based on their resistance to radiotherapy and chemotherapy. Although the highly invasive nature of glioblastoma cells is also implicated in the failure of current therapies, little is known whether cancer stem cells are involved in invasiveness. In this study, we isolated cancer stem-like from a human glioblastoma cell line, U251, and assessed their migratory and invasive ability. These cells showed the enhanced migratory and invasive ability on both in vitro and in vivo. The highly invasive potential of cancer stem cells depends on MMP-13 enzymatic activity, thus MMP-13 might be a potential therapeutic target for glioblastomas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：グリオブラストーマ、腫瘍幹細胞、浸潤、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

近年、脳腫瘍を初めとする様々な腫瘍組織中に自己複製能・多分化能・無限増殖能を併せ持つ「腫瘍幹細胞」が数%程度存在していることが明らかとなってきた。この腫瘍幹細胞が分化増殖することで腫瘍組織全体を構成すると考えられている。しかしながら現在主流を占めている化学療法や放射線療法は

腫瘍幹細胞に対しては効果が低いことが明らかとなり、治療耐性細胞となった腫瘍幹細胞が初期治療緩解後の腫瘍再発に深く関与していると提唱されている。一方でグリオブラストーマではグリオーマ細胞の強い浸潤能が予後不良の主因とされている。このような現状にもかかわらず、腫瘍幹細胞の幹細胞維持機構はもちろん、どの様に腫瘍形成（あるいは悪性化）に関わっているのか明らかにされていないのが現状である。

２．研究の目的

本研究は、以下の３項目について検討し、低グレードグリオーマの悪性化やグリオブラストーマ治療への抵抗性獲得に腫瘍幹細胞が深く関与していることを明らかにするとともに、腫瘍幹細胞の幹細胞性維持機構や増殖・分化メカニズムなどの特質を解明することで新たな治療法の開発を目指すものである。

（１）腫瘍幹細胞群の単離

Sphere 法により腫瘍幹細胞を単離し、形態や腫瘍幹細胞マーカーの発現を検討する。

（２）腫瘍幹細胞の特質解明

幹細胞性維持因子の遺伝子発現を shRNA で抑制し、腫瘍幹細胞の特質を解明する。

（３）腫瘍幹細胞の浸潤能の検討

腫瘍幹細胞の in vito および in vivo における浸潤能を検討し、鍵となる分子を明らかにする。

３．研究の方法

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 細胞株より腫瘍幹細胞群（Sphere 形成細胞）を調整し、以下の項目を検討した。

（１）腫瘍幹細胞群の単離

神経幹細胞の単離などで一般的に用いられる Sphere 形成法（EGF および bFGF などの増殖因子を添加した無血清培地中で約１ー２週間浮遊培養を行う）により、Sphere を形成した細胞を単離し、腫瘍幹細胞群とした。この時、培養皿に接着し、Sphere を形成しなかった細胞群を非腫瘍幹細胞群とした。

（２）腫瘍幹細胞の特質解明

腫瘍幹細胞は正常幹細胞と多くの類似点を有するとされている。腫瘍幹細胞群で幹細胞マーカーの遺伝子発現を RT-PCR にて検討を行った。また腫瘍幹細胞の特徴でもある薬剤排出関連遺伝子の発現および抗癌剤に対する薬剤耐性能も検討した。さらには神経細胞への分化誘導を行い、神経マーカー抗体を用いた細胞免疫染色で確認した。

（３）腫瘍幹細胞の浸潤能の検討

腫瘍幹細胞の浸潤能についてラット脳スライスあるいはマトリゲルを用いた Boyden Chamber法により浸潤能を評価した。腫瘍幹細胞をヌードマウスの脳内に移植し、腫瘍形成能の検討をよび病態組織学的解析を行った。

また、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)の遺伝子発現をRT-PCRで解析し、特異的に発現するMMPをshRNAにより発現抑制し、腫瘍幹細胞の浸潤活性に及ぼす影響を検討した。

４．研究成果

（１）腫瘍幹細胞群の単離

グリオーマ細胞を増殖因子添加無血清培地中で培養することにより約２週間で Sphere を形成する（図１A 右）。同時に培養皿に接着し、Sphere を形成しなかった細胞群（非腫瘍幹細胞群）も得られた（図１A 左）。Sphere 形成細胞では腫瘍幹細胞マーカーである CD133 の発現が mRNA （RT-PCR 解析）および蛋白レベル（CD133 抗体を用いた FACS 解析）において認められた（図１B,C)。

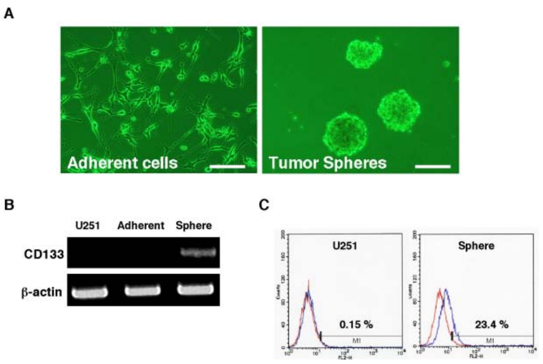


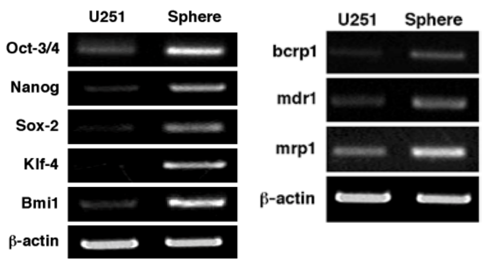
図１

（２）腫瘍幹細胞の特質解明

腫瘍幹細胞群では幹細胞マーカー（Oct-3/4, Nanog, Sox-2, Klf-4, Bmi1）の遺伝子が高発現していた（図２左)。加えて腫瘍幹細胞の特徴でもある ABC トランスポーター薬剤排

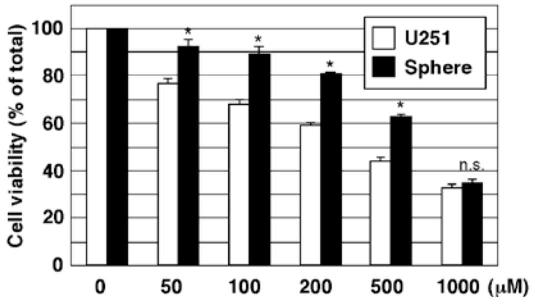
出関連遺伝子の発現も顕著に誘導されていた（図２右）。

図２



抗癌剤（カルボプラチン）に対する薬剤耐性能を細胞死アッセイ（LDH アッセイ）により評価したところ、Sphere 細胞は親株に比べて強い薬剤耐性を有していた（図３）。

図３

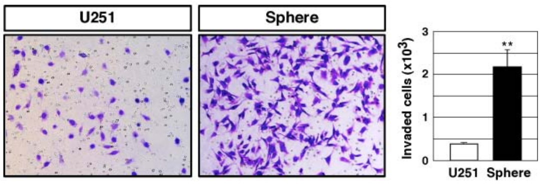


また腫瘍幹細胞は神経様細胞へ分化可能であり分化能を有していることを明らかにした（data not shown）。

（３）腫瘍幹細胞の浸潤能の検討

浸潤能を検討すべく、Boyden チャンバーを用いたマトリゲル浸潤アッセイを行い in vitro の浸潤能を検討したところ、Sphere 細胞群で強い浸潤活性が認められた（親株細胞の約５倍）（図４）。

図４

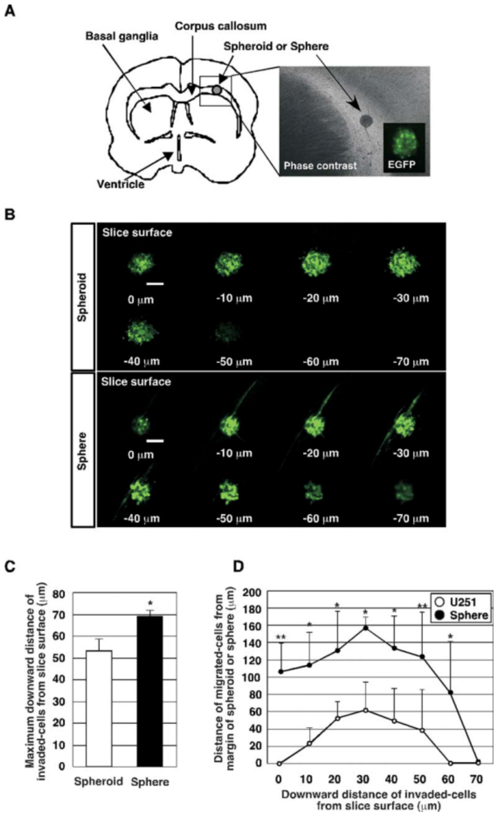


マトリゲルは血管基底膜の成分であり、癌細胞の浸潤アッセイに一般的に用いられている。しかしながら、グリオーマ浸潤は他の癌浸潤とは異なる浸潤様式を示す（グリオーマ細胞は血管外浸潤をせず、脳実質内を浸潤）。そこで、より生理的条件に近い形でグリオーマ細胞の浸潤を検討するため、ラット脳スライスを用いた浸潤アッセイを行った（図５）。

図５A に示す様に、緑色蛍光（EGFP）を発現させた Sphere 細胞あるいは親株細胞をラット脳スライスの脳梁上におき、48 時間共培養を行う。グリオーマ細胞の浸潤様式を共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元的に解析した。

Sphere 細胞は深部方向（親株細胞は約 55 ミクロメートル、Sphere 細胞は 70 ミクロメートル）および側方（親株細胞は最大 100 ミクロメートル、Sphere 細胞は最大 180 ミクロメートル）への細胞浸潤が親株細胞より強く認められた（図５B, C, D）。

図５



次に、Sphere 細胞および親株をヌードマウスの脳内に移植（3x10^5 個）したところ、両細胞群とも脳腫瘍を形成した。しかし、親株細胞の腫瘍は正常組織との境界が明瞭なのに対し、Sphere 細胞で形成された腫瘍は、境界が不明瞭で、かつ腫瘍細胞の浸潤像がはっきりと認められ、in vivo でも強い浸潤能を有することが明らかとなった（図６；T は腫瘍）。

図６

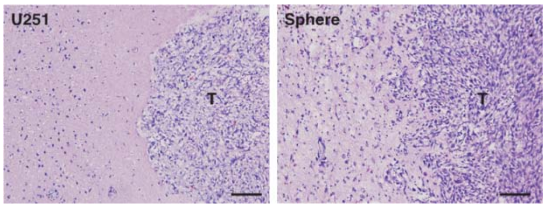


図４ー図６で示した様に、Sphere細胞がin vitroおよびin vivoにおいて強い浸潤活性が認められたので、浸潤に関わる酵素MMPの遺伝子発現をRT-PCRにより検討した（図７）。

MMP-2, MMP-7は親細胞、Sphere細胞ともほぼ同じレベルで遺伝子発現が認められたが、MMP-13の発現がSphere細胞で顕著であった。

図７

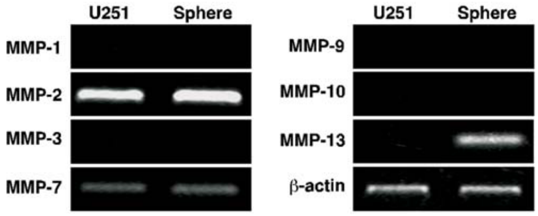
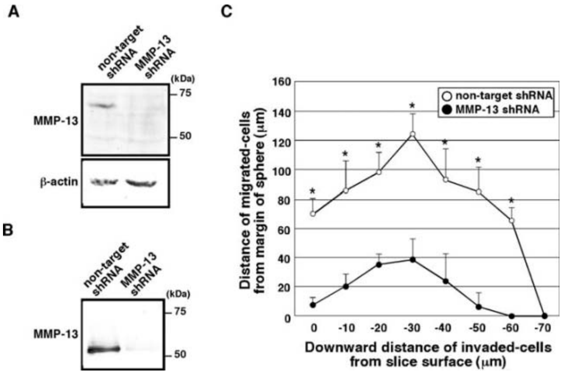


図７の結果から、Sphere 細胞群で MMP-13 の発現が顕著であったことから、Sphere 細胞の強い浸潤能は MMP-13 によるものと考え、MMP-13 の shRNA 遺伝子導入による遺伝子発現抑制（ノックダウン）を行い、ラット脳スライスを用いて浸潤能の評価を行った（図８）。

図８A,B に示す様に MMP-13 shRNA によるノックダウンにより、MMP-13 のタンパク質発現が抑制された（図８A:細胞内の前駆体 MMP-13、図 8B:培地中に分泌された活性型 MMP-13 で MMP-13 抗体を用いた免疫沈降法により検出）。そこで MMP-13 ノックダウン Sphere 細胞（●）を用いて、ラット脳スライスを用いた浸潤アッセイを行ったところ、図８C のグラフに示す様に Sphere 細胞（○）の有する強い浸潤能が抑制された。

図８



＜まとめ＞

以上の結果から腫瘍幹細胞は強い浸潤能を有し、グリオーマの浸潤本体として腫瘍周辺部に浸潤し、腫瘍の増大や外科的摘出後の再発に関与していることが示唆された。また腫瘍幹細胞の浸潤活性には MMP-13 が大きく関与していたことも明らかにした。

最近、私は Sphere 細胞における MMP-13 の発現は幹細胞性維持・誘導因子である Oct-3/4 により誘導されること、さらには shRNA による Oct-3/4 の発現抑制により、Sphere 形成が阻害されることを見いだした（論文投稿準備中）。したがって、Oct-3/4 が悪性グリオブラストーマの腫瘍幹細胞の維持および腫瘍辺縁領域への強い浸潤に重要な役割を担っているものと考えられる。悪性グリオーマは膵臓がんとともに、悪性度が極めて高い腫瘍であり、医学治療が発展した現在においても治療成績は３０年前から大きく変化していない。したがって、本研究で得られた成果を元に、MMP-13 の阻害あるいは Oct-3/4 の機能破綻を誘導する治療が新たな治療法開発に繋がると期待している。

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２件）

1. A. Inoue, <u>H. Takahashi</u>, H. Harada, S. Kohno, S. Ohue, K. Kobayashi, H. Yano, J. Tanaka, T. Ohnishi. Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. International J. Oncology（査読有）37, 1121-1131 (2010)

2. A. Smirkin, H. Matsumoto, <u>H. Takahashi</u>, A. Inoue, M. Tagawa, S. Ohue, H. Watanabe, H. Yano, Y. Kumon, T. Ohnishi, J. Tanaka. Iba1(+)/NG2(+) macrophage-like cells expressing a variety of neuroprotective factors ameliorate ischemic damage of the brain. J Cereb Blood Flow Metab.（査読有）30, 603-615 (2010)

〔学会発表〕（計２件）

1. <u>高橋寿明</u>, 膠芽腫における腫瘍幹細胞の性状解析と浸潤能の検討, Neuro2010 日本神経科学大会, 2010 年 9 月 2-4 日, 神戸

2. H.Takahashi, Spheres isolated from human glioblastoma promote tumor progression and possess cancer stem cell-like phenotype, 9th European meeting of Glial cells, 2009年9月8-12日, フランス（パリ）

〔その他〕
ホームページ
http://www.proteo.ehime-u.ac.jp/

６．研究組織
(1)研究代表者
高橋　寿明（TAKAHASHI HISAAKI）
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20363228