

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791369

研究課題名（和文） 腫瘍幹細胞の自己複製能の解明

研究課題名（英文） Identification of the mechanism of self-proliferation in brain tumor stem cells

研究代表者

松本 健一（Matsumoto Kenichi）

九州大学・医学研究院・研究員

研究者番号：80423581

研究成果の概要（和文）：

腫瘍幹細胞における自己複製能の解明を目的として、本研究により患者手術検体よりグリオーマ細胞の初代培養を行いグリオーマ幹細胞株の樹立を目指した。培養条件は無血清、EGF や FGF などの成長因子を加えて行い、これまでの結果 4 例で 10 継代以上の長期培養が可能であった。しかしこれらの培養細胞の腫瘍幹細胞能が現時点では証明できていないので自己複製能の解明には至っていない。

研究成果の概要（英文）：

To dissect the biological mechanism of the self-proliferation in glioma stem cell, we first tried to establish the glioma cell lines with stem cell activity. We removed the glioma tissues from the patients and performed primary culture of these cells with EGF and EGF in serum free conditon. So far, we have established four cell lines which continue to proliferate more than 10 passages. Since we have not proved the stem cell potential of these cells, the mechanism of the self-proliferation have not been identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2100000	630000	2730000
2010年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

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

キーワード：脳腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマ（神経膠芽腫）は浸潤、増殖能が強い未分化な腫瘍細胞からなる脳原発の悪性腫瘍である。外科手術だけでは治

癒困難な腫瘍であり、新たに導入されたテモゾロマイドによる化学療法や放射線治療を加えても平均的な生存期間は 12-15 ヶ月と予後不良であり、新たな画期的な治療法の確立

が望まれている。このような中さまざま腫瘍で腫瘍幹細胞の存在が報告され、グリオブラストーマでも同様な脳腫瘍癌幹細胞の報告が相次いでいる(Sanai et al, N Engl J Med 353:811-22, 2005)。最近になってこれらの脳腫瘍癌幹細胞は放射線、化学療法に対して抵抗性を示すことが明らかにされ (Bao S et al. Nature 447:756-760, 2006)、グリオブラストーマの治療抵抗性や再発の原因として考えられている。したがってグリオブラストーマの治療成績向上のためには脳腫瘍癌幹細胞をターゲットとした治療法の開発が重要である。

## 2. 研究の目的

グリオブラストーマから分離培養された脳腫瘍癌幹細胞の複製機序を明らかにすることを目的とする。特に正常神経幹細胞の複製機構との差違に着目し、脳腫瘍癌幹細胞特異的な複製メカニズムの解明を目指す。神経幹細胞は複製時に非対称分裂により、幹細胞としての性格を保持した細胞と、それよりも多少分化した細胞を生み出す結果、幹細胞自体の数に変化はないことが知られている (Zhong W et al, Current Opinion in Neurobiology 18:4-11, 2008)。一方、グリオブラストーマが増殖するためには脳腫瘍癌幹細胞も増えなければならない。したがって、脳腫瘍癌幹細胞では幹細胞の数を結果的に増やすことができる対称分裂が行われているのではないかと仮定している。最近の報告によると、ショウジョウバエの神経細胞では非対称分裂に関連する蛋白の機能喪失により脳腫瘍が発生することが明らかにされており、human の脳腫瘍癌幹細胞においても非対称分裂が起きないような機構が働いていると推測される。本件研究では脳腫瘍癌幹細胞における非対称分裂関連蛋白質の発現

とその作用機序を明らかにして、自己複製メカニズムの解明につなげる。

## 3. 研究の方法

当院でのグリオブラストーマ症例の外科摘出組織を神経幹細胞培養条件下で培養し、neurosphere を形成する細胞を継代し、腫瘍幹細胞を分離培養する。確立された細胞の腫瘍幹細胞能を確認し自己複製メカニズムの解明のモデルとして利用することを試みた。

(1) 無血清条件下で継代できるグリオーマ細胞株の樹立

具体的には患者から摘出した脳腫瘍 (グリオーマ) 組織を無血清、EGF や FGF などの成長因子を含む条件で継代培養を行った。当初は neurosphere を形成する浮遊細胞として培養したが、途中からラミニンでコーティングした条件で接着細胞として培養を行った。

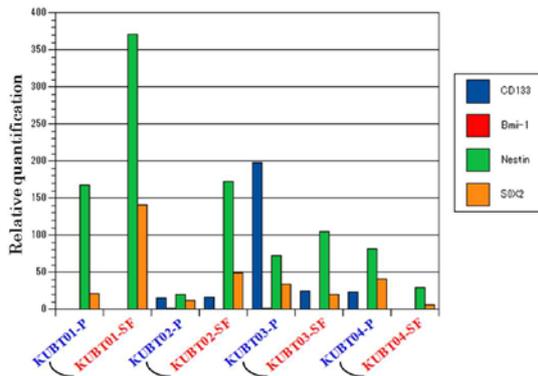
(2) これまで長期培養が可能であった細胞を用いて、元の腫瘍とペアで分化マーカーの遺伝子発現を real time PCR 法で解析した。

## 4. 研究成果

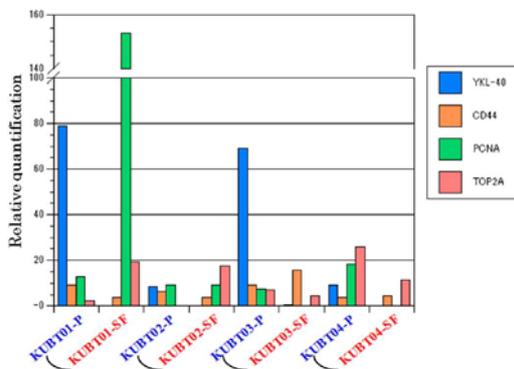
まず本研究を行うためにグリオブラストーマの手術検体から EGF や FGF などの成長因子を含んだ培地で初代培養を行い、脳腫瘍幹細胞の自己複製能を解析できる in vitro でのモデル作成を目指して、幹細胞能を持ったグリオブラストーマ細胞の長期培養を行うことを試みた。その結果現在までに4例のグリオブラストーマを成長因子培養下で長期培

養を行うことに成功した。これらの培養細胞は複数のマイクロサテライトマーカを用いた LOH 解析により、もとの腫瘍細胞と同じ genotype を保持していることが証明され、また SOX2 や nestin などの未分化な表面マーカーを発現しており、腫瘍幹細胞の性質を持つことが示唆された（下図参照）。

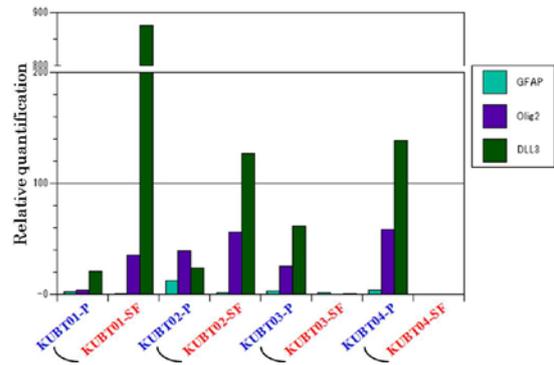
幹細胞マーカーの相対定量



間葉系マーカーの相対定量



分化マーカーの相対定量



次の段階としてこれら継代培養された脳腫瘍幹細胞における細胞分裂と非対称分裂関連蛋白の発現を解析した。解析する分子として Drosophila での機能が解析されている遺伝子の human homolog である aspm, lgl-1, plk-1, Aura A kinasen などを選択した。蛍光免疫染色や western blotting により発現パターンと発現量を蛋白レベル検討しているが、現在まで lgl-1 の解析を行ったがはっきりとした発現は認められなかった。またこれらの培養細胞の腫瘍幹細胞能を証明するできれおらず、したがって自己複製メカニズムの解明には現時点に至っていない。

### 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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

松本 健一 (Matsumoto Kenichi)  
九州大学 医学研究院 研究員  
研究者番号：80423581