

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22日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791372

研究課題名（和文） 神経幹細胞と腫瘍幹細胞の比較解析

研究課題名（英文） Comparison between neural and tumor stem cells

研究代表者

秋山 幸功（AKIYAMA YUKINORI）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50404653

研究成果の概要（和文）：

神経幹細胞と腫瘍幹細胞の比較実験において、腫瘍幹細胞の増殖力が神経幹細胞に対して、非常に弱いことが判明した。また、分離培養する際の条件も、神経幹細胞と同様のものでは、まわりの腫瘍細胞（非神経幹細胞）の影響と思われる、培養の困難性があることが判明した。腫瘍幹細胞に特異的と考えられている CD133 陽性細胞の培養に成功し、その細胞が neuron 系、glia 系、oligodendroglia 系の 3 系統に分化誘導することが可能であった。CD133 陽性細胞が長寿遺伝子として知られる SIRT 1 遺伝子を発現していることが判明した。今後、脳腫瘍幹細胞における SIRT1 遺伝子の発現量の相違を検索することにより、その細胞内における動態について検討する。

研究成果の概要（英文）：

In the comparison between neural and tumor stem cells, there was some differences such as a weakness of proliferation in the tumor stem cells. We succeeded to culture some cell lines of tumor stem cells from glioma patients. The tumor stem cells could differentiate into neuronal, glial and oligodendroglial cell lineage which were demonstrated by immunocytochemistry. The circumference of the tumor cells which was non-tumor-stem cells might affect to proliferation of the tumor stem cells. The SIRT 1 gene known as a long life gene was appeared in the CD133 positive cells. The efficacy of the SIRT1 gene in the cells will be examined by retrieving the difference of the amount of the SIRT1 gene expression in the brain tumor stem cell in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：脳神経外科学

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：神経幹細胞、腫瘍幹細胞

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は概念的には存在することは、示唆されているが、定義すら決まっていないのが実情ではあるが、それでもこの10年間で、幹細胞が悪性化することや、ある種のがん細胞が幹細胞と共通する形質を持っていることが示され、癌幹細胞と幹細胞とくに神経幹細胞にいろいろな共通点があることがわかっていく。逆に幹細胞と癌幹細胞との相違点は同定されていないのが現状である。そこで、正常脳の神経幹細胞と脳腫瘍から採取した癌幹細胞とを比較検討することで、その相違点を明らかにし、さらに脳腫瘍の治療に有用な表面マーカーなどの検出を試みることは、非常に重要と考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 脳神経系における悪性腫瘍の代表である glioma から癌幹細胞と思われる性質のある細胞群を抽出、培養する。
- (2) 癌幹細胞に特異的に発現している遺伝子を検索する。
- (3) 癌幹細胞のスクリーニングに必要な遺伝子を選択する。
- (4) 特異分子を同定することにより特異抗体を作成し、その有効性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 悪性脳腫瘍 (glioma とくに glioblastoma) から癌幹細胞の抽出・培養
手術により摘出された腫瘍組織より、癌幹細胞の抽出・培養を行い、癌幹細胞の cell line を作成する。癌幹細胞の多様性を考慮して、cell line は最低でも10種類は作成する予定である。現在われわれは、1種類の cell line の作成に成功し、今後もその数を増やすこととした。
- (2) 癌幹細胞と、神経幹細胞および骨髄幹細胞の遺伝子プロファイルを比較解析

上記の計画1で得られた癌幹細胞の cell line と、正常の神経幹細胞および骨髄幹細胞の遺伝子発現を、DNA アレイで比較解析する。現在までの知見では、400-500個程度の遺伝子の発現に差異が認められると推測しているが、特に、細胞の接着に関与する遺伝子群の発現が高まっていたとの報告もあることから、特に細胞接着に関与する遺伝子の発現に注目して解析を行う。

(3) 癌幹細胞に特異的に発現している遺伝子を探索

上記計画(2)で得られた情報から、特に、癌幹細胞の同定に有用と考えられる遺伝子群を検索する。

本研究は事前に札幌医科大学倫理委員会の承認を得ることを前提として研究をすすめるものとし、本研究の対象となった者またはその家族に対しては、十分にインフォームドコンセントを行って、了解を得たもののみ施行した。

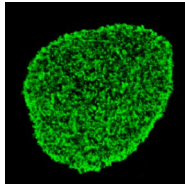
4. 研究成果

神経幹細胞と同様に癌幹細胞も浮遊培養法により bFGF, EGF の存在下で可能であることがわかっている。われわれは、これまで神経幹細胞の浮遊培養法、分化誘導などについて報告してきた。今回、臨床的に脳腫瘍 (glioma) と診断された患者の摘出組織より癌幹細胞の特徴を有した細胞の cell line の作成に成功した。

(1) 腫瘍幹細胞の cell line

神経幹細胞と同様に nestin 陽性細胞の sphere 化による浮遊培養に成功した。

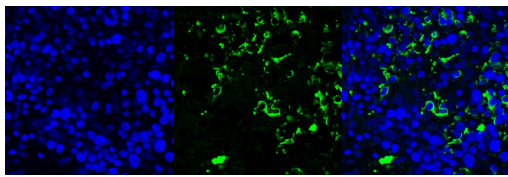
71F Glioblastoma



nestin

また、Glioblastoma よりも低悪性度の Anaplastic astrocytoma の患者さん (59M) から抽出した組織より培養した細胞においても、神経幹細胞と同様に nestin 陽性細胞の細胞塊 Sphere の形成が認められる。

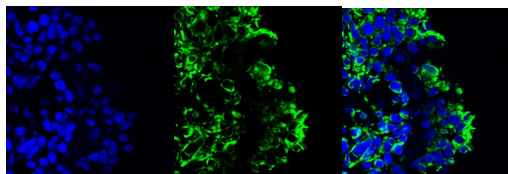
Figure 2 (59M anaplastic astrocytoma)



Hoechst CD133 Merg

この細胞において同時に CD133 陽性細胞が認められた。

Figure 3 (59M anaplastic astrocytoma)

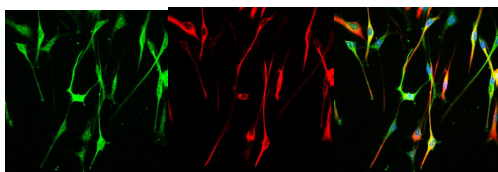


Hoechst nestin Merg

(2) 培養細胞の多分化能

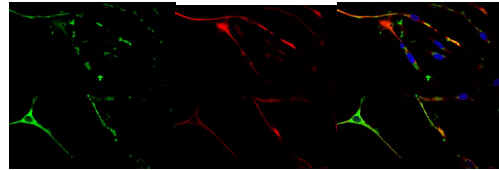
GBM (70F) 10%FBS 付加した培養液にて処理すると分化が促進され、神経系、glia 細胞系、oligodendroglia 系の 3 系統に分化することが示され、培養された細胞が多分化能を有することが証明され、tumor stem cell または少なくとも progenitor cells であることが示された。

Figure 4a (with FBS; GBM 71F)



β -tubulin GFAP merge

Figure 4b (with FBS; GBM 71F)

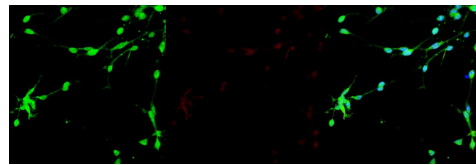


04 GFAP merge

(3) Trophic factors による分化誘導

hPDGF, NT-3, IGF-1 (10ng/ml) 2 週間の処理によって Sphere が glia 系細胞がほとんど存在せず、neuron 系の細胞に分化が進むことが示された。

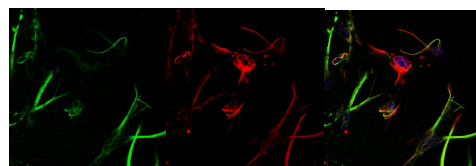
Figure 5a (with hPDGF, NT-3, IGF-1; GBM 71F)



β -tubulin GFAP merge

FBS, hNT-3 10ng/ml にて 2 週間処理したものは、neuron と glia 系細胞が同様に認められた。

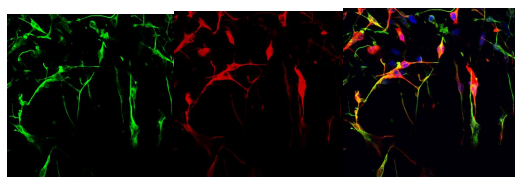
Figure 5b (with hPDGF, NT-3, IGF-1; GBM 71F)



β -tubline GFAP merge

FBS, hGDNF 10ng/ml にて 2 週間処理した (GBM 71F) ものでは、Neuron、Glia の両細胞系に分化が誘導され、一部は、両方に陽性を示す細胞も認められた。

Figure 5c (with hPDGF, NT-3, IGF-1; GBM 71F)

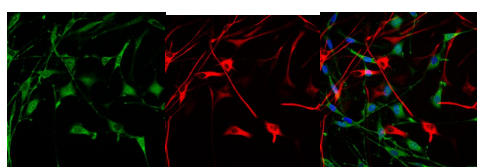


β -tubulin GFAP merge

(4) SIRT1 遺伝子の発現について

70F GBM 細胞において FBS 存在下で bFGF, EGF 存在下では、一定の割合で SIRT1 遺伝子の発現が認められることが分かった。

Figure 6 (with FBS; 70F GBM)

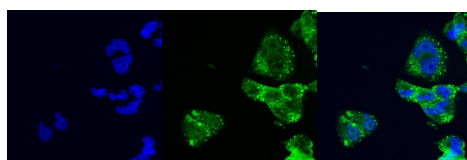


SIRT1 GFAP merge

(5) 脱分化の可能性

T98 glioma cell line においても培養条件により CD133 陽性を示す細胞の出現が認められ、脱分化が起こっている可能性が示唆された。

Figure 4 (T98 cell line)



Hoechst CD133 Merg

分離培養した細胞は、CD133, nestin に陽性を示す細胞塊 sphere を形成し、分化を誘導することにより抗 β -tubulin, GFAP, O4 抗体などに陽性となることがわかった。

また、分離培養した癌幹細胞の特徴を有した Sphere の増殖力、分化力を現在測定中であり、臨床像の違い（悪性度、病理学的相違点）などとともにその相違点、類似点などに関して

は詳細に検討する予定である。また、同細胞は、蛋白質/ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 の発現も認められることが判明し、今後その発現量、臨床像などの相違などを比較検討することにより癌幹細胞に投機的な遺伝子などの探索も行う予定である。

癌幹細胞の培養が予想以上に困難で時間を要したことが研究遅延の原因としてあげられる。神経幹細胞では、周辺の細胞の増殖力が非常に低い事から、幹細胞の抽出は容易であったと考えられる。しかし、癌幹細胞の場合、周辺の細胞の増殖力も高く、幹細胞のみの抽出が困難であった可能性がある。また、われわれの結果から、通常の腫瘍細胞も幹細胞の培養条件下では、細胞塊 sphere を形成することが認められ、腫瘍の脱分化が起こっていた可能性が示唆された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 幸功 (AKIYAMA YUKINORI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50404653