

平成 23 年 5 月 24 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791376

研究課題名(和文) オーファン受容体 TROY によるグリオーマ幹細胞の増殖・分化の制御と治療への応用

研究課題名(英文) The role of orphan receptor, TROY, in the proliferation and differentiation of glioma stem cells

研究代表者 久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398463

研究成果の概要(和文)：

最近、TROY のリガンドとして報告された $LT\alpha$ の発現が、TROY と同様に脳室下帯(subventricular zone; SVZ)の GFAP 陽性の神経幹細胞やアストロサイト系譜の細胞に認められた。U251 グリオーマ細胞において、TROY の発現が CD133 陽性グリオーマ幹細胞にも認められた。CD133 陽性/TROY 陽性グリオーマ幹細胞と SVZ の TROY 陽性/GFAP 陽性神経幹細胞における TROY のシグナルの役割の解明は、そのシグナリング制御によるグリオーマ治療法の開発に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：

We have reported that TROY was expressed in the GFAP-positive neural stem cells and/or astroglial progenitor cells in the subventricular zone (SVZ). In the present study, I showed that $LT\alpha$, a ligand of TROY, was expressed in these GFAP-positive cells in the subventricular zone (SVZ) of adult mice. Recently, it has been reported that brain tumor stem cells might be derived from normal neural stem or progenitor cells of the SVZ. I found the expression of TROY in CD133-positive glioma stem cells in U251 glioma cells. These results shed light on the association of TROY-positive/GFAP-positive neural stem cells in the SVZ and TROY-positive/CD133-positive glioma stem cells in the CNS.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：アストロサイト、グリオーマ、サイトカイン、受容体、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者はこれまでノーザンブロット法、

ウエスタンブロット法、*in situ* hybridization 法、免疫染色法、免疫電子顕

顕鏡法等を用いて、中枢神経発生過程における TROY の発現を検討してきた。その結果、胎生期の nestin や Musashi1 陽性の神経上皮細胞や放射状グリアに加え、生後から成獣の SVZ の神経幹細胞や大脳皮質の GFAP 陽性のアストロサイトに TROY の発現が認められた。TROY の過剰発現により、神経系前駆細胞から神経細胞への分化抑制や、グリオーマからアストロサイト様細胞への分化誘導が認められたことから、TROY のシグナルは、神経幹細胞／神経系前駆細胞においては神経細胞への分化抑制に、グリア前駆細胞においてはアストロサイトへの分化誘導に関与している可能性が考えられる。したがって、グリオーマの分化における TROY のシグナルを解明することにより、神経・グリア細胞と癌の共通の発生メカニズムの解明と癌治療への応用へつながる可能性が期待出来る。

(2) 発現しているマーカー (nestin, Musashi1 など) や *in vitro* での自己複製能、シグナル伝達経路等の類似性から、神経幹細胞と脳腫瘍幹細胞の密接な関連が報告されている。TROY はヒトのグリオーマ細胞においても発現が認められること、発生過程において、グリオーマ幹細胞にも発現の認められる CD133 陽性の放射状グリアや脳室帯 (ventricular zone; VZ) の神経系前駆細胞にも発現している可能性が高いことから、グリオーマ細胞及びグリオーマ幹細胞における TROY のシグナルを解明することにより、脳腫瘍の病態解明、治療への応用に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) グリオーマ細胞、及びグリオーマ幹細胞における TROY の発現。
- (2) TROY 固有のリガンドの同定。
- (3) グリオーマ細胞、及びグリオーマ幹細胞の増殖・分化における TROY とそのリガンドの機能を *in vitro* で解明。
- (4) 脳腫瘍モデルマウスを作製し、*in vivo* でのグリオーマ細胞における TROY とそのリガンドの機能を解明。

3. 研究の方法

- (1) U251 グリオーマ細胞における TROY の過剰発現

TROY を U251 グリオーマ細胞株に電気穿孔法等を用いて過剰発現させ、TROY からのシグナリング (NF- κ B や JNK の活性化) を免疫沈降法やウエスタンブロット法により検討する。TROY を過剰発現させた U251 グリオーマ細胞の増殖や突起の形成、分化、生存等に関

して検討する。

- (2) TROY リガンドの中枢神経系における発現と発現細胞の同定

皮膚において TROY が LT α と結合し、NF- κ B の転写を活性化することが報告された。中枢神経系やグリオーマにおける LT α の発現、及び LT α 発現細胞の同定により、LT α が TROY のリガンドとして機能する可能性に関して検討する。

- (3) FACS 及び免疫染色法によるグリオーマ幹細胞における TROY の発現の検討

U251 グリオーマ細胞 0.3% に CD133 陽性のグリオーマ幹細胞が含まれることが報告されており、TROY 陽性細胞に CD133 陽性のグリオーマ幹細胞が含まれるかを TROY 及び CD133 に対する抗体を用いて、FACS 及び免疫染色法で検討する。

4. 研究成果

- (1) グリオーマ細胞における TROY の過剰発現

U251 グリオーマ細胞株に TROY-IRES-EGFP を過剰発現させ、TROY に対する抗体を用いて免疫細胞染色を行った結果、EGFP 陽性細胞に TROY の強い発現が認められた。EGFP/TROY 陽性の U251 細胞は突起の伸展が誘導され、成熟アストロサイト様の形態変化を示した (図 1) ことから、グリア前駆細胞やグリオーマ細胞において、TROY のシグナルがアストロサイトへの分化誘導に関与している可能性が考えられる。

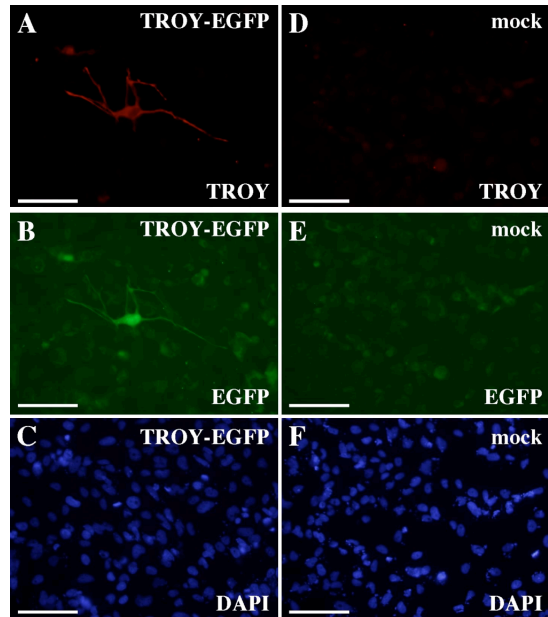


図 1 TROY の過剰発現によるグリオーマ細胞株 U251 の分化： グリオーマ細胞株 U251 は、TROY-IRES-EGFP の過剰発現 (A, D; TROY

染色, B, E; EGFP, C, F; DAPI 染色)により、突起の伸展が誘導され、成熟アストロサイト様の形態に変化する。Scale bars = 50 μm 。

(2) 成獣マウス中枢神経系における $\text{LT}\alpha$ の発現

$\text{LT}\alpha$ に対する抗体を用いて、 $\text{LT}\alpha$ の成獣マウス中枢神経系における発現を検討した結果、SVZ や VZ に強い発現を認め、海馬や線条体、脳梁にも広く発現が認められた。成獣の SVZ においては、GFAP 陽性の神経幹細胞やアストロサイト系譜細胞を含む type B 細胞、PSA-NCAM 陽性の神経系前駆細胞である type A 細胞、EGFR 陽性の増殖細胞を含む type C 細胞があり、神経/グリア新生に関与することが知られている。これらのマーカーに対する抗体と $\text{LT}\alpha$ に対する抗体とを用いた二重免疫染色を行った結果、 $\text{LT}\alpha$ 陽性細胞のほとんどが GFAP 陽性 (図 2) であったが、PSA-NCAM の発現は全く認められなかった。(図 3)。また SVZ の一部の $\text{LT}\alpha$ 陽性細胞に神経幹細胞のマーカーである nestin の発現を認め、VZ の上衣細胞においても nestin と $\text{LT}\alpha$ との共存が認められた (図 4)。以上の結果より $\text{LT}\alpha$ は SVZ の神経幹細胞やアストロサイト系譜細胞を含む type B 細胞、及び VZ の上衣細胞に発現し、TROY 発現細胞である type B 細胞やその近傍に発現している可能性が高いことから、TROY のリガンドとして作用しアストロサイトへの分化やグリア新生等に関与する可能性が考えられる。

(3) CD133 陽性グリオーマ幹細胞、及び CD133 陰性グリオーマ細胞における TROY の発現解析

抗 TROY 抗体を用いた蛍光免疫染色法により、U251 グリオーマ細胞における TROY の発現を検討したところ、球形で小型の細胞にのみ TROY の発現が認められた。これらの細胞は、U251 グリオーマ細胞の中では非常に少数の細胞集団で、DAPI による核染色で観察すると、ほとんどの細胞で核分裂像が認められた。また、U251 グリオーマ細胞の大部分を占める、突起をもった扁平な細胞には TROY の発現が認められず、また核分裂像もみられなかった。これらのことから、TROY 陽性細胞は、TROY 陰性細胞とは異なり、細胞分裂の活発な細胞であると考えられた。

U251 グリオーマ細胞には、アストロサイト系譜のマーカーである GFAP を発現している分化した細胞と発現していない、より未分化なグリオーマ幹細胞があることが報告されている。そこで抗 TROY 抗体、及び抗 GFAP 抗体を用いた二重免疫染色を行ったところ、GFAP 陽性細胞の大部分は、突起を形成し、扁

平で TROY を発現していなかった。TROY 陽性の球形で小型の細胞では、大部分が GFAP 強陽性、または GFAP 弱陽性 (図 5) で、少数の GFAP 陰性細胞が認められた。

さらに U251 グリオーマ細胞の 0.3%に、CD133 陽性/GFAP 陰性のグリオーマ幹細胞が認められることが報告されていることから、抗 TROY 抗体、及び抗 CD133 抗体を用いて二重免疫染色法を行った。その結果、CD133 の発現は、球形で小型の細胞にのみ認められ、CD133 陽性細胞のほとんどすべてが TROY を発現していた。また TROY 陽性細胞のほとんどすべてが CD133 を発現していた (図 6)。したがって、TROY は U251 グリオーマ細胞の中でも CD133 陽性/GFAP 陰性グリオーマ幹細胞に加え、これまで報告されていない CD133 陽性/GFAP 陽性グリオーマ幹細胞が存在し、その細胞にも発現している可能性が示唆された。

成獣の SVZ の神経幹細胞はグリオーマ幹細胞となる可能性が注目されているが、SVZ の GFAP 陽性の神経幹細胞はグリオーマ幹細胞のマーカーである CD133 は発現していないことが報告されており、SVZ の GFAP 陽性の神経幹細胞が CD133 陽性のグリオーマ幹細胞となるかは未だ不明である。今回の結果より、CD133 陽性/GFAP 陽性/TROY 陽性グリオーマ幹細胞が SVZ の GFAP 陽性の神経幹細胞である可能性が考えられる。今後、より詳細に CD133 陽性/GFAP 陽性/TROY 陽性グリオーマ幹細胞を解析することにより、SVZ の神経幹細胞とグリオーマ幹細胞における TROY シグナリングの役割を解明し、そのシグナリング制御により、グリオーマ治療法開発に貢献することが期待できる。

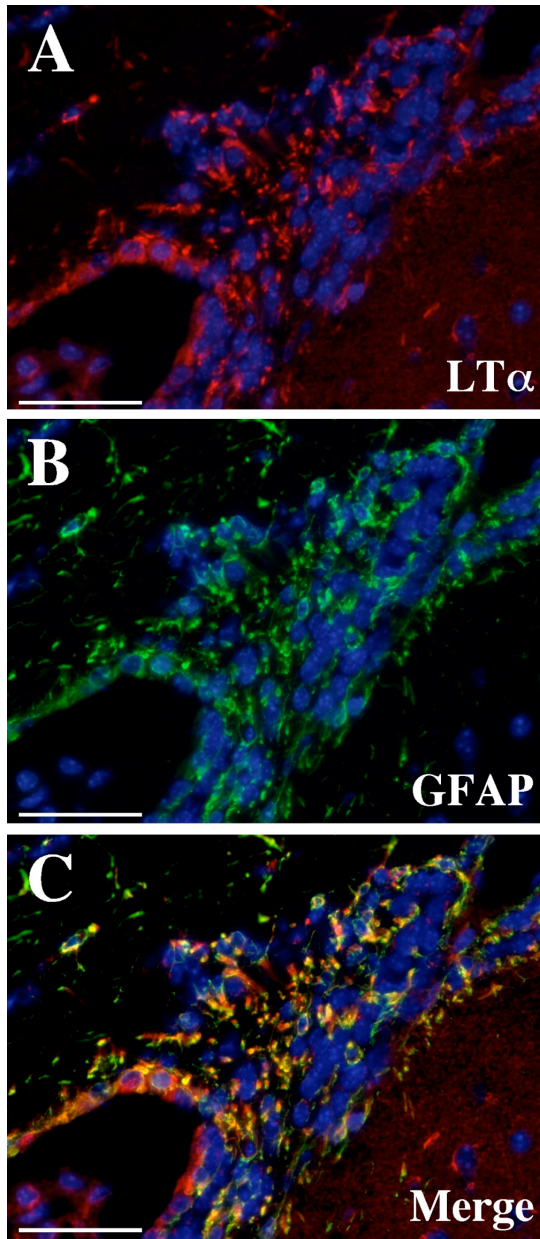


図2 成獣脳室下帯におけるLT α とGFAPとの二重免疫染色：LT α (A、赤)とGFAP (B、緑)の共存 (C、黄)が認められた。Scale bars = 50 μ m.

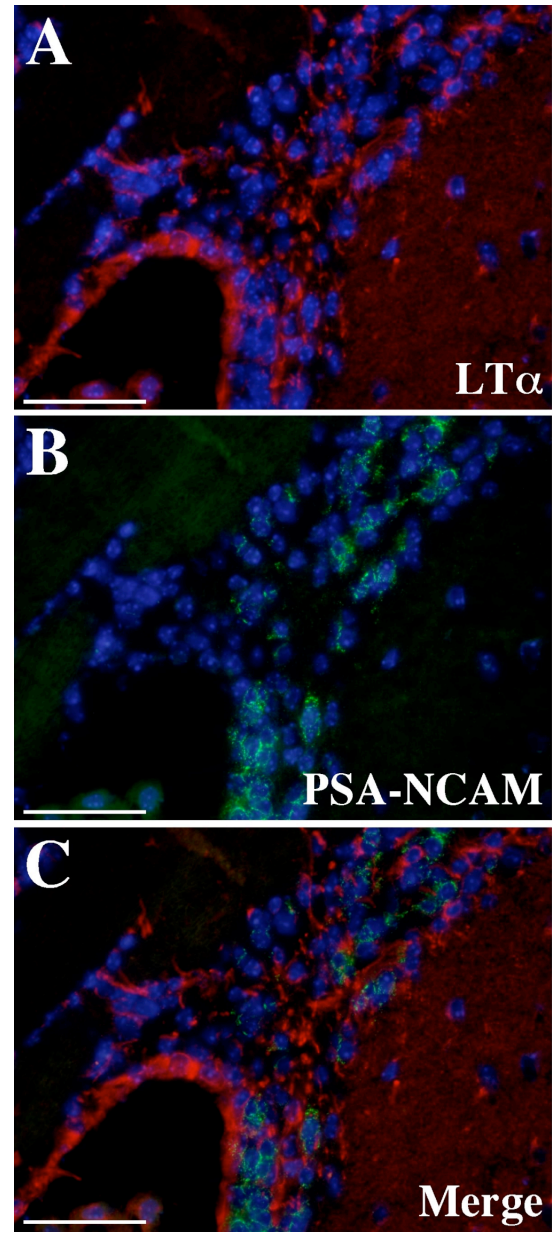


図3 成獣脳室下帯におけるLT α とPSA-NCAMとの二重免疫染色：LT α (A、C 赤)とPSA-NCAM (B、C 緑)の共存は認められなかった。Scale bars = 50 μ m.

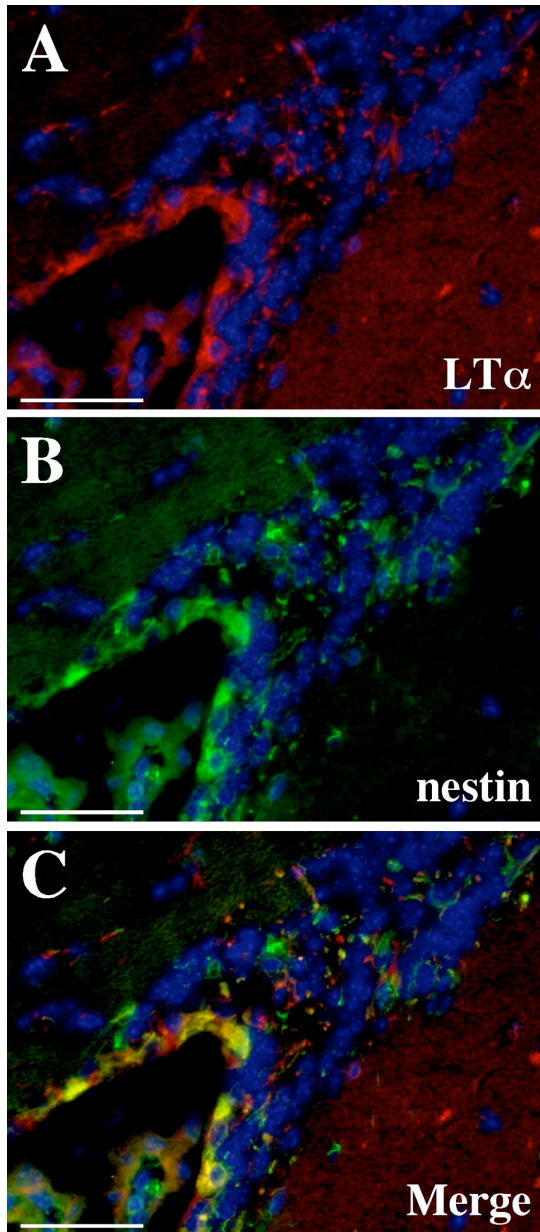


図4 成獣脳室下帯における $LT\alpha$ と nestin との二重免疫染色: $LT\alpha$ (A、赤)と nestin (B、緑) の共存 (C、黄) が認められた。Scale bars = 50 μ m.

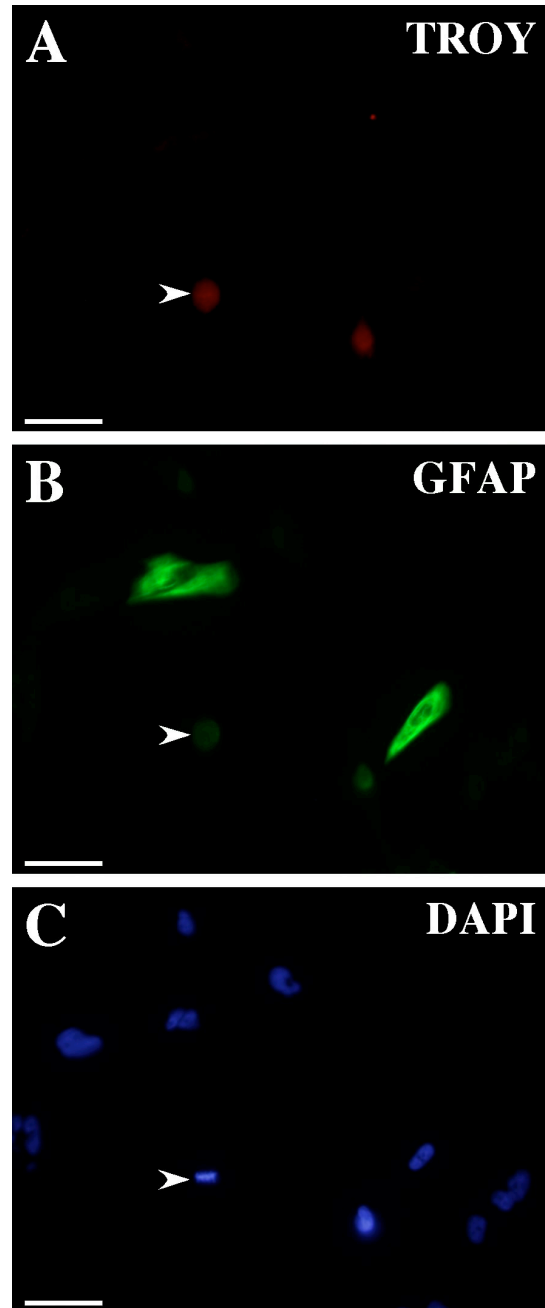


図5 U251 グリオーマ細胞における TROY 及び GFAP の二重免疫染色: TROY 発現細胞 (A、赤) は球状を呈し、GFAP の発現 (B、緑) が認められた。TROY 陽性細胞において、核染色 (C、青、arrowhead) でクロマチンの凝縮を認めた。Scale bars = 50 μ m.

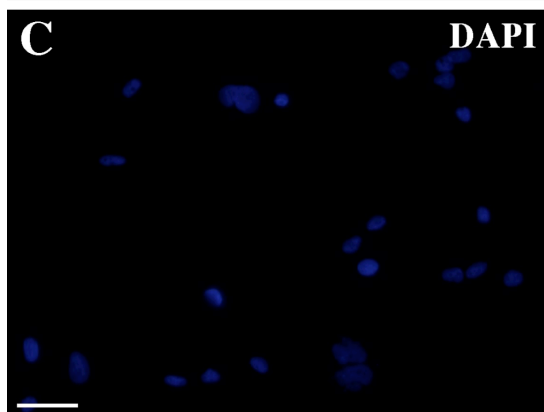
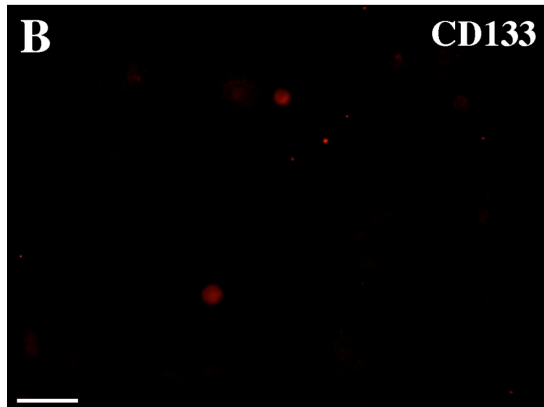
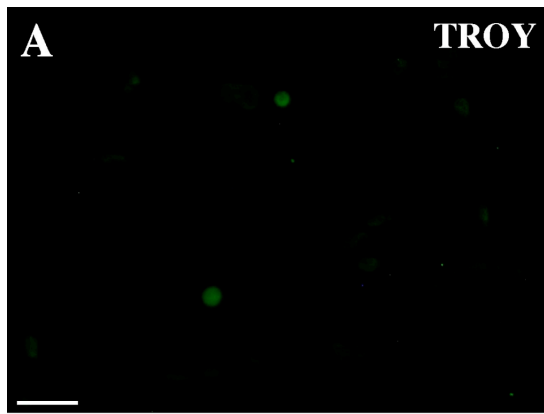


図6 (右図) U251 グリオーマ細胞における TROY 及び CD133 の二重免疫染色：TROY 発現細胞(A、赤)は球状を呈し、CD133 の発現 (B、緑) を認めた。Scale bars = 50 μ m.

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

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398463

(2) 研究分担者

()

研究者番号：
(3) 連携研究者 ()

研究者番号：