

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 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390278

研究課題名（和文）

新規グリオーマ幹細胞制御因子 Sox11 と Plagl1 の機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of Sox11 and Plagl1 in glioma stem cells.

研究代表者

近藤 亨 (KONDO TORU)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30270573

研究成果の概要（和文）：

グリオーマ幹細胞（GSC）と正常神経幹細胞（NSC）における Sox11 と Plagl1 の発現と機能解析を進め、以下の研究成果をあげた。（1）GSC における Sox11 の転写は、NeuroD/Neurogenin 依存ではなく、別の転写制御を受ける（転写制御ゲノム配列（200bp）を決定）。（2）Plagl1 は、NSC 維持や DNA 損傷修復に働いている。また、腫瘍形成に関わる遺伝子群の発現制御にも関与している。（3）ヒトグリオーマ組織から腫瘍形成能を保持した GSC 株の至適調整法と培養法を確立し、それらの遺伝子発現プロファイルを作成した。

研究成果の概要（英文）：

We have examined about the expression of Sox11 and Plagl1 and their functions in glioma stem cells (GSC) and neural stem cells (NSC) and found the following results. (1) Expression of Sox11 in GSC is not regulated by either NeuroD or Neurogenin, both of which induce Sox11 expression in neural differentiation. We have identified the DNA domain (200bp) that regulates Sox11 expression in GSC. (2) Plagl1 is involved in both the maintenance of stemness in NSC and their DNA repair. (3) We have established efficient methods for human GSC preparation and their maintenance and examined their expression profiles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：脳腫瘍学・グリオーマ幹細胞

1. 研究開始当初の背景

代表的な脳腫瘍であるグリオーマはその発生臓器の重要性から治療方法は著しく制限され、また生物学的にもその腫瘍を構成する

細胞の治療に対する抵抗性は高く、これまで様々な治療法が開発・試行されてきたにも関わらず、20 年以上予後の改善を見ていない。近年、申請者及び様々な研究グループによっ

てグリオーマにグリオーマ幹細胞 (Glioma-stem cells, GSC) の存在が明らかされ、それがグリオーマの治療抵抗性の重要な原因であることが証明された。つまり、GSC を明確に同定し、それを精製且つ性状解析することによって治療標的を同定することが、本難治性疾患に対する唯一のアプローチであると考えられる。

現在までに様々な癌幹細胞濃縮法 (CD133 陽性細胞、side population 細胞等) が報告されているが、その濃縮率は低く (1% 未満)、癌幹細胞の性状解析や新規癌治療方法の創出には不十分である。この問題点を克服するために、申請者らは p53 欠損神経幹細胞 (NSC) やオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) に発癌性 H-Ras を強制発現させ、腫瘍形成能の極めて強い GSC 株を作製した (10 個の細胞移植によりグリオーマを形成)。これら人工マウス GSC 株とヒトグリオーマ浮遊細胞塊およびヒトグリオーマ組織を用いた網羅的な遺伝子発現解析により、GSC が転写因子 Sox11 陰性/転写制御因子 Plagl1 陽性であることを見いだした。更に、Sox11 と Plagl1 の機能を解析した結果、Sox11 は癌抑制因子として働き、その機能の 1 つが癌遺伝子 Plagl1 の発現を抑制していることであることを発見した。

2. 研究の目的

本研究課題では申請者らが同定したグリオーマ治療標的候補因子 Sox11 と Plagl1 の発現制御機構と GSC 維持機構について更に検討を加えることを目的とした。加えて、様々なヒトグリオーマから腫瘍形成能を保持した GSC 株の樹立を遂行し、今後の GSC 治療法解析のための基盤整備を目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題について以下の 3 つの研究を遂行し、Sox11 と Plagl1 の機能解析と各種ヒト GSC 株の樹立を遂行した。

(1) Sox11 転写調節領域の決定、Sox11 転写制御因子の同定とその機能解析を試みる。

(2) Plagl1 分子の機能解析 (NSC と GSC)、GSC における Plagl1 の下流調節因子群の同定とそれらの機能解析。

(3) 様々な悪性度のヒトグリオーマから腫瘍形成能を保持した GSC 株の樹立とそれらの遺伝子発現プロファイルを作製し、今後の GSC 研究の基盤を整備する。

4. 研究成果

(1) Sox11 に関わる解析結果

正常NSCから神経細胞 (ニューロン) への分化にはNeuroDおよびNeurogenin1/2等の転写因子の機能が必須である。これら転写因子はSox11の発現を誘導し、神経分化を誘導する。これらの結果から、神経分化誘導転写因子の強制発現がGICを神経細胞へ分化誘導し、腫瘍形成を抑制するかについて検討した。予想に反して、これら神経分化誘導因子はGICにSox11の発現および分化マーカーの発現を誘導しなかった。GSCでは未解明のメカニズムにより神経分化が抑制されているものと考えられる。

Sox11遺伝子の発現制御機構の解明を目的として、ヒトSox11上流転写制御領域ゲノムDNA (hSox11-pro、約5kbp) をクローニングすると共に、様々なhSox11-proの断片を作製し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したSox11発現モニタリングベクター群を作製した。これらベクター群をヒトおよびマウスGICと正常NSCに導入し、神経分化誘導過程で働く転写調節領域 (約200bp) を決定した。この領域はヒト、マウス、ラット間で保存され、神経細胞分化に重要な配列であると考えられる。

(2) Plagl1に関わる解析結果

正常NSCでの Plagl1の働きを検討するために、抗Plagl1抗体を用いた胎生および成体マウス脳の免疫染色を行った。その結果、Plagl1は脳室下帯に存在するNestin陽性NSCに強く発現することを発見した。この結果は、既に報告されているin situ hybridizationのデータと一致している。また、胎生期14.5日胚から調整した初代培養NSCの90%以上がPlagl1陽性であり、その発現が分化に伴い減少することを確認した。更に、Plagl1の強制発現はNSCの分化を抑制し、そのノックダウンがNSCの増殖を抑制することも発見した。

マウスGSCにおけるPlagl1の機能解析をすすめた結果、Plagl1がDNA修復に関与していることを発見した。更に、人工マウスGSC株、Plagl1の強制発現株、ノックダウン株を用いた遺伝子発現解析の結果、1104遺伝子がPlagl1により発現誘導され、1633遺伝子が抑制されることが発見した (倍率変化が2以上)。これら遺伝子群には、幹細胞性の維持、浸潤能、細胞増殖や抗がん剤耐性に係る遺伝子が複数含まれている。

(3) 新規ヒトGSC株の作製

グリオーマサンプルの至適細胞分散方法と培養方法を確立し、腫瘍形成能を保持した複数のGSC株を樹立した。その中には、腫瘍形成能

を保持した世界初のAnaplastic oligodendroglioma (WHO grade III) と Diffuse astrocytoma (WHO grade II) 株を含む。

これらヒト GSC 株を用いた遺伝子発現解析を遂行し、GSC では Sox11 の発現が抑制、Plagl1 の発現が亢進していることを確認した。また、ヒト GSC での Sox11 の強制発現が Plagl1 の発現抑制と細胞増殖抑制に働く事も再確認した。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. 近藤 亨 (2013) 癌幹細胞を標的とした治療のこれからーグリオーマ幹細胞をモデルとして. *Frontiers in Gastroenterology* 18, 68-73. 査読無
2. 近藤 亨 (2011) 脳腫瘍の癌幹細胞治療戦略. *医薬ジャーナル* 47, 103-108. 査読無
3. 近藤 亨 (2011) 脳腫瘍の CSC. *BIO Clinica* 26, 39-43. 査読無
4. 近藤 亨 (2011) グリオーマ. *臨床検査* 55, 477-482. 査読無
5. Kondo, T. (2011) Tumorigenesis of glioma-initiating cells: Role of Sox11. *Stem Cells and Cancer Stem Cells* 93-98. URL: <http://link.springer.com/book/10.1007/978-94-007-1709-1/page/1>. 査読有
6. Hide, T., Takezaki, T., Nakatani, Y., Nakamura, H., Kuratsu, J., & Kondo, T. (2011) Combination of a Ptgs2 inhibitor and an EGFR signaling inhibitor prevents tumorigenesis of oligodendrocyte-lineage derived glioma-initiating cells. *Stem Cells* 29, 590-599. DOI: 10.1002/stem.618. 査読有
7. Inoda, S., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Morita, R., Takahashi, A., Asanuma, H., Nakatsugawa, M., Nishizawa, S., Tamura, Y., Tsuruma, T., Terui, T., Kondo, T., Ishitani, K., Hasegawa, T., Hirata, K., & Sato, N. (2011) Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *Am. J. Pathol.* 178, 1805-1813. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.01.004. 査読有
8. Takezaki, T., Hide, T., Takanaga, H., Nakamura, H., Kuratsu, J., & Kondo, T. (2011) Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. *Cancer Science* 102, 1306-1312. DOI:

10.1111/j.1349-7006.2011.01943.x. 査読有

9. Kondo, T. (2011) Stem cells and cancer stem cells -new insights. *Advances in Cancer Stem Cell Biology* 17-31. URL: <http://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-0809-3/page/1>. 査読有

10. 近藤 亨 (2010) 膠芽腫. *Clinical Neuroscience* 28, 24-28. 査読無

11. 近藤 亨 (2010) 癌幹細胞と分子標的薬. *日本臨床社* 68 986-990. 査読無

12. 近藤 亨 (2010) 幹細胞生物学からみた脳腫瘍の発生機序. *日本臨床社* 68, 24-28. 査読無

13. 近藤 亨 (2010) 人工グリオーマからの考察. *再生医療* 9, 42-46. 査読無

14. Kondo, T. (2010) Mouse induced glioma-initiating cell models and therapeutic targets. *Anticancer Agents Med Chem.* 10, 471-480. PMID: 20879984 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 近藤 亨 (2012) 人工癌幹細胞を用いた基礎研究と治療戦略の創出. 第 49 回日本生化学会北海道支部例会、特別講演、北海道大学、2012/7/20

2. 近藤 亨 (2011) グリオーマ幹細胞の分化能力. 第 70 回日本癌学会、シンポジウム、名古屋国際会議場、2011/10/4

3. Toru Kondo (2011) Sox11 is a novel tumor suppressor in glioma. 3rd International Sox Meeting. Symposium, Grainau (Germany), 2011/9/12

4. Toru Kondo (2011) Combination of a Ptgs2 inhibitor and an EGFR-signaling inhibitor prevents tumorigenesis of oligodendrocyte-lineage derived glioma-initiating cells. The 9th Stem cell symposium. Symposium, Izumi Garden Gallery, 2011/5/14

5. Toru Kondo (2010) Induced glioma-initiating cell models reveal novel therapeutic targets. 15th World Congress on Advances in Oncology&13th International Symposium on Molecular Medicine. Symposium (invited speaker), Hotel Poseidon Resort (Greece), 2010/10/8

6. 近藤 亨 (2010) Cancer stem cell と標的分子. 第 14 回日本がん分子標的治療学会、Year in Review、タワーホール船堀、2010/7/8

7. 近藤 亨 (2010) 幹細胞の性状解析. 第 51 回日本臨床細胞学会、シンポジウム、パシフィコ横浜、2010/5/31

[その他]
ホームページ等
<http://www.igm.hokudai.ac.jp/stemcell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 亨 (KONDO TORU)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号：30270573

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大西 丘倫 (OHNISHI TAKANORI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70233210
小松 賢志 (KOMATSU KENSHI)
京都大学・放射線生物研究センター・教授
研究者番号：80124577