

## 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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390283

研究課題名（和文） 脳腫瘍幹細胞における幹細胞性制御因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of stemness regulators in brain cancer stem cells

研究代表者

戸田 正博 (Toda Masahiro)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20217508

研究成果の概要（和文）：

本研究では、脳腫瘍幹細胞(BCSC)における幹細胞制御分子の同定を目的として、分離 BCSC を用いた網羅的な遺伝子発現比較解析を行った結果、新規の BCSC 抗原 KLRC2 を同定した。さらに幹細胞制御分子スクリーニング解析を行った結果、BCSC 増殖制御分子 MIF を同定した。KLRC2 および MIF は、ともに正常脳組織で発現を認めず、一方、BCSC およびグリオーマ において高発現しており、BCSC マーカーとして、さらにグリオーマ治療標的分子としてその有用性が期待される。

研究成果の概要（英文）：

To identify genes that are highly expressed in brain cancer stem cells (BCSC), we performed cDNA microarray analysis using isolated BCSCs, glioma cells and neural stem cells, and identified a new BCSC antigen, KLRC2. To identify genes that regulate the stemness in BCSC, we screened with a lentivirus expressing cDNA library system and identified MIF as a novel proliferation factor in BCSC. Both genes are highly expressed in gliomas and BCSCs but not normal brain, suggesting that KLRC2 and MIF could be not only BCSC markers but also therapeutic targets for glioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：脳腫瘍幹細胞、グリオーマ、増殖因子、未分化、クローニング

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究の進展に伴って、さまざまな悪性腫瘍においても癌幹細胞が存在するこ

とが明らかとなり、また抗癌剤や放射線療法に抵抗性を示すことから、脳腫瘍を含めた難治性の癌治療のための重要な標的としてその性状解析が急速に進められている。

実際に、薬剤排出能の高い Side population (SP) 分画や神経幹細胞マーカーCD133 抗体を利用して、脳腫瘍組織や脳腫瘍細胞株から brain cancer stem cell (BCSC) が分離されている。一方、最新の報告では CD133 陰性の BCSC の存在も明らかにされており、現在の手法では BCSC を精製できないため、正確な性状解析はできず、また BCSC 特異的な遺伝子は同定されていない。

BCSC は neural stem cell (NSC) から発生するという考えが支持されているが、BCSC の発生機序の詳細は現在なお不明であり、実際のグリオーマ発生部位と NSC の存在部位とを対比すると、すべての BCSC が NSC から発生しているとは考えにくい。オリゴデンドロサイト前駆細胞から NSC へのリプログラムや線維芽細胞から iPS が樹立された報告は、分化した細胞からのリプログラム化による多分化能獲得の可能性と、一方で、腫瘍化の危険性を示唆する。一方、現在まで、BCSC の分離・精製が困難であったため、BCSC の分子制御機構の詳細は不明であり、グリオーマ細胞とは異なる特徴的な性質である多分化能 (幹細胞性) を制御する分子は同定されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、第一に我々の BCSC 解析技術を基盤に、新たな BCSC 分離・精製法を開発し、精製された BCSC とグリオーマ、NSC との遺伝子発現を比較解析して、新規の BCSC 遺伝子 (マーカー) の同定を試みる。

第二に、幹細胞性制御分子の発現を指標とした未分化維持制御分子のスクリーニングシステムを構築し、BCSC における幹細胞性制御因子の同定を行い、BCSC 治療標的分子としての機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) BCSC 抗原分子の同定

分離 BCSC とグリオーマは基本的に遺伝子・蛋白発現でかなり共通したパターンを呈することが推察されるため、BCSC の分離数を増やして、網羅的発現解析を行うことにより、BCSC 間で共通した発現パターンを示す新規分子の同定を試みる。具体的には Affimetrix 社製 Gene Chip を用いて、分離した BCSC とグリオーマ、NSC の網羅的遺伝子発現比較解析により、新規 BCSC 分子を同定する。同定分子の発現特異性を明らかにするため、正常脳組織、グリオーマ、BCSC における発現解析を行う。

### (2) BCSC 未分化維持制御因子の同定と機能解析

BCSC 未分化性維持制御分子スクリーニングシステムを構築する。BCSC 増殖をモニターするため、分泌型ルシフェラーゼと GFP を共発現するレンチウイルスベクターを作成し、BCSC 細胞株に遺伝子導入して、スクリーニングを行う。

同定遺伝子の BCSC における機能解析を行うため、過剰発現と遺伝子ノックダウンによるスフェア形成能 (幹細胞維持・自己複製)、多分化能の変化を解析し、未分化維持制御分子としての機能を検証する。また、同定分子の発現特異性を明らかにするため、正常脳組織、グリオーマ、BCSC における発現解析を行う。

NOD/SCID マウス脳内に、分離した BCSC を移植し、マウス BCSC モデルを作成する。標的分子を knockdown するための shRNA およびコントロールの shRNA を組み込んだレンチウイルスベクターを作成し、マウスモデルの脳腫瘍内へ定量的投与し、in vivo における治療標的分子としての有効性を解析する。

## 4. 研究成果

グリオーマ組織から神経幹細胞培地を用いた sphere 培養を行ない、長期培養可能な3つの BCSC 細胞株を樹立した。これら3つの細胞株は多系統への分化能力を有し、かつ免疫不全マウス脳内に移植することにより、神経膠腫に似た組織像を呈する脳腫瘍を形成した。そこで Affimetrix 社製 Gene Chip を用いて、分離 BCSC、グリオーマ、NSC の網羅的な遺伝子発現解析比較を行った結果、新規 BCSC 抗原である KLRC2 を同定した。KLRC2 は、NK 細胞と一部の T 細胞に特異的に存在する 1 回膜貫通型タイプ II タンパク質であり、MHC クラス・HLA-E 分子を認識する活性化レセプターである。発現解析の結果、KLRC2 は、正常脳組織において発現を認めず、一方、BCSC およびグリオーマにおいて高発現していることが明らかになった。さらに KLRC2 のシグナル伝達経路から、グリオーマ細胞増殖への関与が示唆される。以上、KLRC2 は BCSC マーカーとしてのみならず治療標的分子としての有用性が期待され、今後は BCSC における機能解析を行う予定である。

幹細胞制御分子発現を指標としたスクリーニング解析により、BCSCの未分化維持に関与する分子としてmacrophage migration inhibitory factor (MIF)を同定した。MIFは炎症を促進するcytokineであるが、詳細な発現解析の結果、正常脳組織での発現は低く、様々な脳腫瘍およびBCSCにおいて高発現を呈していることが明らかになった。siRNAを用いて、MIF発現knockdownによる機能解析を行った結果、グリオーマの細胞増殖を制御していることが明らかになった。次にsiRNA-MIFとsiRNA-p53を同時に用いた解析により、MIF knockdownによるグリオーマ細胞増殖抑制がp53発現に依存すること、また免疫沈降解析により、核内でMIFとp53が結合していることが明らかになった。また、virus vectorに組み込んだMIF shRNAを用いてMIF発現を阻害することにより、3種類のBCSCの細胞増殖を抑制すること、この細胞増殖抑制は細胞死が関与していることを明らかにした。さらに、BCSC脳内移植マウスにMIF shRNAを腫瘍内投与すると、生存期間の延長が認められた。以上、MIFは正常脳組織に発現せず、BCSCおよびグリオーマにおいて高発現し、またMIF発現をknockdownすることによりin vitroのみならずin vivoにおいてBCSCに対する抗腫瘍効果を示すことから、グリオーマの標的分子としての有用性が示された。

##### 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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1 Ohta S, Misawa A, Fukaya R, Inoue S, Kanemura Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival and proliferation of neural stem/progenitor cells  
J Cell Sci 125, 3210-3220, 2012  
DOI: 10.1242/jcs.102210 (査読有)
- 2 Takahashi S, Fusaki N, Ohta S, Iwahori Y, Iizuka Y, Inagawa K, Kawakami Y, Yoshida K, Toda M  
Downregulation of KIF23 suppresses glioma proliferation  
J Neurooncol 106(3), 519-529, 2012  
DOI:10.1007/s11060-011-0706-2 (査読有)
- 3 Tabuse M, Ohta S, Ohashi Y, Fukaya R, Misawa A, Yoshida K, Kawase T, Saya H, Thirant C, Chneiweiss H, Matsuzaki Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M

Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer stem cells  
Mol Cancer 10 (60), 2011 online journal DOI: 10.1186/1476-4598-10-60 (査読有)

- 4 Takahashi S, Yamada-Okabe H, Hamada K, Ohta S, Kawase T, Yoshida K, Toda M  
Downregulation of uPARAP mediates cytoskeletal rearrangements and decreases invasion and migration properties in glioma cells.  
J Neurooncol 103(2), 267-276, 2011  
DOI: 10.1007/s11060-010-0398-z (査読有)
- 5 Tsukada-O K, Ohta S, Kawakami Y, Toda M  
Adjuvant effects of formalin-inactivated HSV through activation of dendritic cells and inactivation of myeloid-derived suppressor cells in cancer immunotherapy.  
Int J Cancer 123(1), 119-131, 2011  
DOI: 10.1002/ijc.25319 (査読有)
- 6 Tsukada-O K, Toda M, Usono H, Kawakami Y, Takahashi K  
Targeted inhibition of the p38 MAP kinase of IL-10-secreting CD25- T regulatory cells in cancer immunotherapy  
Eur J Immunol 40(4), 1011-1021, 2010  
DOI: 10.1002/eji.200939513 (査読有)
- 7 Tabuse M, Yaguchi M, Ohta S, Kawase T, Toda M  
A simple behavioral analysis of locomotor function after brain injury in mice  
J Clin Neurosci 17(11), 1412-1416, 2010  
DOI: 10.1002/eji.200939513 (査読有)
- 8 Fukaya R, Ohta S, Yamaguchi M, Fujii H, Kawakami Y, Kawase T, Toda M  
Isolation of cancer stem-like cells from a side population of a human glioblastoma cell line, SK-MG-1  
Cancer Let 291(2), 150-157, 2010  
DOI:10.1016/j.canlet (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

- 1 戸田正博  
再発悪性グリオーマに対するペプチドワクチン 第9回信濃町脳腫瘍セミナー 2013/02/16 慶應義塾大学医学部新教育研究棟 (東京)
- 2 齊藤克也、戸田正博、吉田一成

- リボソーム合成阻害を介した治療標的分子としてのグリオーマ新規抗原 EFTUD1 の解析  
第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会  
2012/11/26 グランドホテル広島(広島)
- 3 戸田正博、斉藤克也、植田 良、佐々木光、吉田一成  
進行・再発悪性グリオーマに対する VEGFR ワクチンの第 1/2 相臨床試験  
第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会  
2012/11/25 グランドホテル広島(広島)
- 4 戸田正博  
遺伝学的解析に基づいた神経膠腫の治療戦略 第 24 回脳神経外科臨床講座  
2012/11/17 ベルサール八重洲(東京)
- 5 戸田正博  
神経膠芽腫に対する VEGFR ワクチンの臨床試験 第 8 回信濃町脳腫瘍セミナー  
2012/02/18 慶應義塾大学医学部新教育研究棟(東京)
- 6 戸田正博  
神経膠腫に対する免疫療法について グリオーマ(神経膠腫)の患者・家族のためのセミナー  
2012/01/28 慶應義塾大学(東京)
- 7 斉藤克也、戸田正博、吉田一成  
新規グリオーマ抗原遺伝子 EFTUD1 の同定とその解析  
第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会  
2011/11/27 下呂温泉 水明館(岐阜)
- 8 田伏将尚、大多茂樹、大橋陽平、深谷雷太、三沢 彩、吉田一成、河瀬 斌、佐谷秀行、Thirant C、Chneiweiss H、松崎有未、岡野栄之、河上 裕、戸田正博  
ヒトグリオーマ及びグリオーマ癌幹細胞における HOXD9 の機能解析  
第 12 回日本分子脳神経外科学会  
2011/10/14 パシフィコ横浜(横浜)
- 9 大多茂樹、田伏将尚、大橋陽平、深谷雷太、三沢 彩、吉田一成、河瀬 斌、佐谷秀行、Thirant C、Chneiweiss H、松崎有未、岡野栄之、河上 裕、戸田正博  
Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer-initiating cells 第 54 回日本神経化学会大会  
2011/09/27 山代温泉(石川)
- 10 戸田正博  
癌幹細胞を標的とした Sox6 ペプチドワクチンの開発  
第 2 回創薬 Innovation Forum 2011  
2011/07/23 秋葉原 UDX Theater(東京)
- 11 戸田正博  
再発悪性グリオーマに対する VEGFR ペプチドワクチンの臨床試験  
第 20 回 J・K・W フォーラム  
2011/05/14 順天堂大学会議室(東京)
- 12 戸田正博  
再発悪性グリオーマに対する癌ワクチンの臨床試験  
第 7 回信濃町脳腫瘍セミナー  
2011/02/19 慶應義塾大学(東京)
- 13 戸田正博、田伏将尚、大多茂樹、深谷雷太、高橋里史、吉田一成  
脳腫瘍幹細胞・グリオーマ共通抗原の発現および機能解析  
第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会  
2010/11/2 軽井沢プリンスホテル(長野)
- 14 植田 良、戸田正博、副田明男、河瀬 斌、河上 裕、吉田一成  
ヒトグリオーマ抗原 SOX6 とその T 細胞エピトープペプチドの同定  
第 69 回日本脳神経外科学会  
2010/10/29 福岡コンベンションセンター(福岡)
- 15 高橋里史、戸田正博、吉田一成  
Glioma における KIF23 発現の検討と機能解析  
第 69 回日本脳神経外科学会  
2010/10/28 福岡コンベンションセンター(福岡)
- 16 深谷雷太、大多茂樹、松崎有未、河上裕、岡野栄之、河瀬 斌、吉田一成、戸田正博  
Brain tumor initiating cell と MIF の役割  
第 69 回日本脳神経外科学会  
2010/10/28 福岡コンベンションセンター(福岡)
- 17 深谷雷太、大多茂樹、松崎有未、河上裕、岡野栄之、河瀬 斌、吉田一成、戸田正博  
Brain tumor initiating cell と p53 結合分子 MIF の役割  
第 11 回日本分子脳神経外科学会  
2010/08/27 東北大学医学部 良陵会館(宮城)
- [図書](計 2 件)
- 1 Toda M Glioma Antigen  
Glioma: Immunotherapeutic approaches, R Yamanaka (Ed.), In Landes Bioscience 749, 77-83, 2012 総ページ数 232
- 2 Saito K, Yoshida K, Toda M  
Brain tumor stem cells and anti-angiogenetic therapy  
Cancer Stem Cells The Cutting Edge Stanley Shostak (Ed.), InTech, ISBN: 978-953-307-580-8, 2011 総ページ数 606

〔産業財産権〕

○取得状況（計 2 件）

名称：癌ワクチン

発明者：戸田正博、植田 良

権利者：学校法人慶應義塾

種類：特許

番号：特許第 4840858 号

取得年月日：2011/10/14

国内外の別：国内

名称：癌ワクチン

発明者：戸田正博、植田 良、塚田晃三

権利者：学校法人慶應義塾

種類：特許

番号：特許第 4840866 号

取得年月日：2011/10/14

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 正博 (TODA MASAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20217508

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

植田 良 (Ueda Ryo)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30317143