

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700865

研究課題名（和文） ヒト人工がん幹細胞の樹立と悪性脳腫瘍モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of human induced cancer stem cells(iCSCs) and malignant brain tumor models derived from neural stem cells

研究代表者

大西 伸幸 (ONISHI NOBUYUKI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40534540

研究成果の概要（和文）：自己複製能・多分化能を持つ神経幹細胞(NSCs)は悪性脳腫瘍の起源細胞の一つと考えられている。私は、マウス NSCs にごん遺伝子である活性型 ALK を導入し同系マウス脳内に移植したところ、Glioma マーカーならびに増殖マーカーが高陽性であり悪性度が高い脳腫瘍を作製することができた。このモデルを基にヒト NSCs を用いた発がんモデルを構築・解析することで、悪性脳腫瘍の発がん過程における分子メカニズムを解明したいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Neural Stem Cells (NSCs) having self-renewal ability and multipotency are considered as one of the cells of origin of Brain tumors. The NSCs transduced with constitutively activated ALK rapidly formed highly proliferative and invasive brain tumors. Histological features of these tumors are similar to those of human glioblastoma multiforme (GBM) such as necrosis, perivascular cuffing and giant cell formation. Immunohistochemistry analysis revealed that these tumors are positive for glioma markers and proliferation marker. These models are useful for investigating molecular mechanisms of gliomagenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：NSCs, Brain tumor, mouse tumor model, ALK

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍、特にグリオブラストーマ (glioblastoma multiforme: GBM) は原発性脳腫瘍のうち悪性度が最も高く、浸潤の早さから手術による全摘は困難とされており、平均生存期間は約 1 年と極めて予後不良な脳腫瘍である。GBM は放射線療法や化学療法に抵抗性を持ち、効果的な治療法は未だ確立されていない。GBM の性状を理解し新たな治療戦略を考案するためには発がんモデルの構築

が必須であり、既に様々なマウスモデルの構築が進められている (Nat Genet. 25:55-7. 2000, Cancer Cell. 1:269-77. 2002)。自己複製能・多分化能を持つ神経幹細胞 (neural stem cells: NSCs) は脳腫瘍の起源細胞の一つと考えられている。これまでに申請者らは *Ink4a/Arf* 欠損マウス (KO) NSCs にレトロウイルスを用いて活性型 H-Ras 遺伝子を導入し同系マウス脳内に移植することで、高い細胞密度で周囲の脳実質に浸潤性に増殖しヒト GBM

に酷似した特徴を有する脳腫瘍を形成することができた(図1)。本研究では、GBMの発がん過程における分子メカニズムを明らかにするために、このモデルを基にヒト NSCsを用いた GBM 発がんモデルの構築を目指す。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍において高頻度に異常がみられる *Ink4a/Arf* 遺伝子の欠損マウス由来の神経幹細胞分画(NSCs)にがん遺伝子を強制発現させることで、自己複製能と分化能に加えて腫瘍形成能を有する幹細胞様がん細胞(induced cancer stem cells: iCSCs)を誘導することができた。本研究では、ヒト NSCs から iCSCs を誘導し、作製が非常に困難であったヒト悪性脳腫瘍モデルの構築を目指す。ヒト iCSCs 作製の基盤を構築するために、抗腫瘍能を乗り越える様々な方法を駆使して、まず野生型マウス NSCs から iCSCs を誘導する手段を確立する。そして、最終的にヒト iCSCs を作製することによって悪性脳腫瘍の発生過程における分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

悪性脳腫瘍の発がん及びがんの維持に必要な分子メカニズムを明らかにするためにヒト iCSCs の作製を目指す。その前段階として、腫瘍形成過程における抗腫瘍能を乗り越える条件を見つけ出し、*WT* NSCs から iCSCs を誘導する。具体的には以下の方法を行った。

- (1) 既知の *Ink4a/Arf* 抑制因子とがん遺伝子を NSCs に共発現させる。
- (2) iPSCs 誘導の効率化に用いられている低分子化合物を使用し、NSCs の増殖能亢進・未分化状態の維持を誘導し、がん遺伝子を強制発現させる。
- (3) 低酸素濃度培養することで NSCs の生存・増殖能を亢進させ、がん遺伝子を強制発現させる。
- (4) 今回、(1)~(3)において *WT* NSCs から iCSCs を誘導できなかったため、*WT* NSCs ならびに *Ink4a/Arf* KO NSCs に各種がん遺伝子(活性型 EGFR、H-RAS、ALK)を導入し、iCSCs の誘導を試みた。

4. 研究成果

(1) *Ink4a/Arf* KO NSCs に各種がん遺伝子(活性型 EGFR、H-RAS、ALK)を導入し、マウス脳内に移植することで、増殖性・悪性度の高い脳腫瘍を作製することができた(図1)。HE染色の結果より、ヒト GBM の表現型に酷似した脳腫瘍であることが確認された(図2)。

(2) 作製した各種脳腫瘍について、Glioma マーカーである Nestin や GFAP、増殖マーカーである Ki-67 に対する抗体を用いて免疫組織

染色を行った(図3)。EGFR vIII、ALK F1174L、ALK R1275Q -*Ink4a/Arf* KO NSCs により作製した脳腫瘍では Nestin 陽性、GFAP 陽性であったが、H-RAS V12 -*Ink4a/Arf* KO NSCs により作製した脳腫瘍では Nestin 陽性、GFAP 陰性であった。正常細胞において Nestin は神経幹細胞マーカー、GFAP はアストロサイトマーカーであることから、EGFR vIII、ALK F1174L、ALK R1275Q -*Ink4a/Arf* KO NSCs 脳腫瘍は分化型、H-RAS V12 -*Ink4a/Arf* KO NSCs 脳腫瘍は未分化型であることが示唆された。

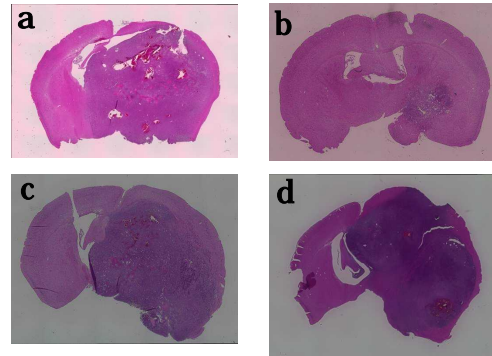


図1. *Ink4a/Arf* KO NSCs に各種がん遺伝子(EGFR vIII(a)、H-RAS V12(b)、ALK F1174L (c)、ALK R1275Q(d))を導入し、マウス脳内に移植することで作製した脳腫瘍

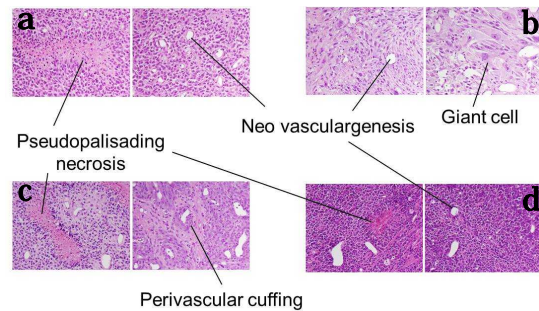


図2. 作製した各種脳腫瘍の HE 染色像

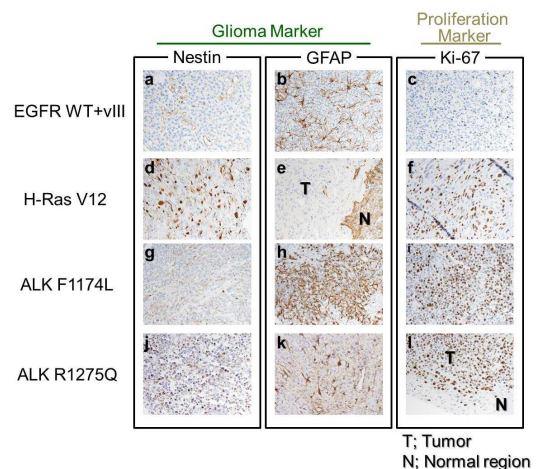


図3. 作製した各種脳腫瘍の免疫組織染色像

(3) *WT* NSCs に EGFR vIII、H-RAS V12 を導入し、マウス脳内に移植しても脳腫瘍が作製されなかったのに対し、ALK R1275Q を導入した *WT* NSCs をマウス脳内に移植することで *Ink4a/Arf* KO NSCs に導入した時と同様に増殖性・悪性度の高い脳腫瘍を作製することができた(図4)。

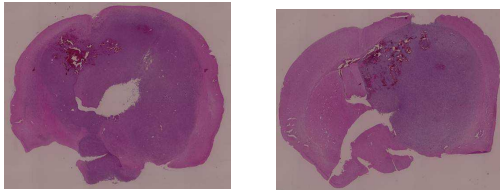


図4. *WT* KO NSCs に ALK R1275Q を導入し、マウス脳内に移植することで作製した脳腫瘍

(4) ALK R1275Q-*WT* NSCs 脳腫瘍は ALK R1275Q-*Ink4a/Arf* KO NSCs 脳腫瘍と同様に、Nestin 陽性、GFAP 陽性の分化型であることが示唆された(図5)。

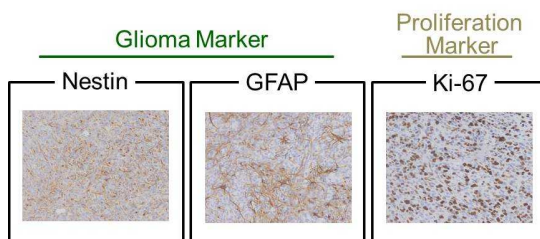


図5. ALK R1275Q-*WT* NSCs 脳腫瘍の免疫組織染色像

(5) 現在、活性型 ALK によるがん抑制遺伝子回避機構の解析を進めており、このモデルを基にヒト NSCs を用いた発がんモデルを構築・解析することで、GBM の発がん過程における分子メカニズムを解明したいと考えている(図6)。

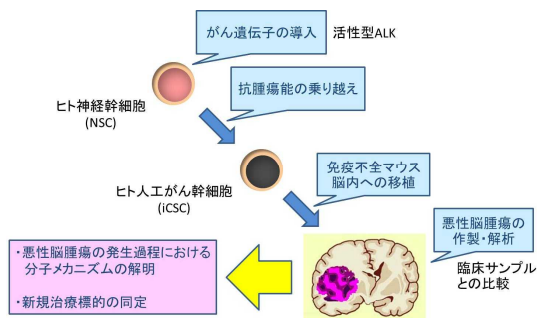


図6. ヒト iCSCs の樹立と悪性脳腫瘍モデルの構築

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5件)

Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M, Saya H
Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells.
Cancer Res. 72:1438-48, 2012. (査読あり)

Kobayashi Y, Shimizu T, Naoe H, Ueki A, Ishizawa J, Chiyoda T, Onishi N, Sugihara E, Nagano O, Banno K, Kuninaka S, Aoki D, Saya H.

Establishment of a choriocarcinoma model from immortalized normal extravillous trophoblast cells transduced with HRASV12.

Am J Pathol. 179:1471-82, 2011. (査読あり)

Motohara T, Masuko S, Ishimoto T, Yae T, Onishi N, Muraguchi T, Hirao A, Matsuzaki Y, Tashiro H, Katabuchi H, Saya H, Nagano O.

Transient depletion of p53 followed by transduction of c-Myc and K-Ras converts ovarian stem-like cells into tumor-initiating cells.

Carcinogenesis. 32:1597-606, 2011. (査読あり)

Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka S, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, Saya H.

Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells.

Neoplasia. 13:784-91, 2011. (査読あり)

Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Onishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M, Miwa M, Okada S, Andreeff M and Saya H

Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor.

Oncogene. 31: 2849-61, 2011. (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

清水 孝恒
骨肉腫病態形成における Fgf2 の役割
第70回日本癌学会学術総会
2011年10月4日
名古屋国際会議場

大須賀 覚
誘導脳腫瘍幹細胞を用いた放射線抵抗性
獲得モデルの確立
第70回日本癌学会学術総会
2011年10月4日
名古屋国際会議場

大西 伸幸
神経幹細胞を用いたマウス脳腫瘍モデル
の構築
第70回日本癌学会学術総会
2011年10月4日
名古屋国際会議場

Oltea Sampetean
グリオーマ幹細胞モデルを用いた薬剤抵
抗性克服
第70回日本癌学会学術総会
2011年10月3日
名古屋国際会議場

植木 有紗
Igf2bp3/Imp3の異常発現は骨肉腫悪性度
を決定する
第70回日本癌学会学術総会
2011年10月3日
名古屋国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://genereg.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 伸幸 (ONISHI NOBUYUKI)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 40534540