

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：22791356

研究課題名（和文） 脳腫瘍幹細胞における MIF の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of MIF in brain tumor initiating cell

研究代表者

深谷 雷太（FUKAYA RAITA）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60348670

研究成果の概要（和文）：

本研究では、グリオーマおよび脳腫瘍幹細胞(BTSC)における MIF の機能解析を行った。グリオーマの MIF 発現を阻害すると、細胞増殖が抑制され、この抑制効果は p53 に依存することが明らかになった。その機序として、細胞内で MIF は p53 と結合し、p53 の腫瘍抑制機能を阻害していることが示唆された。さらに BTSC の MIF 発現を阻害すると、細胞増殖抑制のみならず、in vivo での抗腫瘍効果が認められた。以上の結果から、MIF が BTSC の治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we performed the functional analysis of MIF in glioma and brain tumor stem cells (BTSCs). Knockdown of MIF suppressed the cell proliferation in glioma and the effect was dependent on p53 expression. MIF was shown to bind p53 and inhibit its functions as a tumor suppressor in glioma cells. Moreover, MIF knockdown inhibited not only in vitro cell growth, but also in vivo tumor growth in BTSCs. These results suggest that MIF can be a target for the treatment of BTSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

原発性脳腫瘍で最多を占めるグリオーマに対して、これまで化学療法、放射線療法、手術を合わせた集学的療法がおこなわれているが、近年でもその生存予後は1年程度（神経膠芽腫）とほとんど改善していない。テモゾロマイドは、近年実用化された、唯一その

有効性が実証された抗がん剤であるが、その効果は限定的であり、また、全身の細胞に作用するため、その副作用が問題となってきた。このため、脳腫瘍特異的に作用する新たな分子標的療法の開発が望まれている。

一方、近年のがん研究の進展により、腫瘍に含まれるごくわずかな細胞集団のみが、その発生と維持に重要な役割を担っているこ

とが明らかになってきた。これらの細胞は幹細胞様の性質を持ち、腫瘍幹細胞と呼ばれ、脳腫瘍を含めた多くのがんにおいてその存在が明らかになっている。これらの細胞こそが、がんの治療抵抗性の根源と考えられ、これまでの腫瘍細胞全体をターゲットとした治療とは異なる、この腫瘍幹細胞をターゲットとした治療が求められている。

我々は、脳腫瘍幹細胞 (Brain tumor stem cell; BTSC) の存在に注目し、研究を進めてきた。これまでに glioblastoma 細胞株 SK-MG-1 が多くの side population cell を含有し、これらが BTSC としての性質を有することを報告した。また、glioma 組織由来の BTSC を単離し、これらの BTSC としての性状解析、BTSC に高発現している分子の同定、同定された分子の発現を抑制した際の脳腫瘍細胞の増殖抑制効果を明らかにしている。

具体的には、脳腫瘍患者 22 人から腫瘍の提供を受け、このうち 1 人から得られた細胞より、BTSC を単離することに成功した。この細胞は BTSC としての性質 (自己複製能、多分化能、腫瘍形成能) を有し、マウス脳内への移植において、強い浸潤能、出血性に富む腫瘍を形成し、実際の glioblastoma に類似した phenotype を示すことを確認した。さらに、定量 PCR 法を用いてスクリーニングしたところ、macrophage migration inhibitory factor (MIF) が BTSC において高発現しており、また MIF の発現を阻害することにより、グリオーマ細胞の増殖を著明に抑制することを明らかにした。MIF は、炎症を促進する cytokine として知られる一方で、多数の腫瘍において高発現が確認され、細胞増殖に関与する分子として知られている。ごく最近、我々は、MIF が神経幹細胞において増殖因子として機能していることも明らかにしている。以上から、本研究では MIF に着目して、グリオーマおよび BTSC における機能解析を計画するに至った。

2. 研究の目的

近年のがん研究の進展により、腫瘍幹細胞が、腫瘍の発生と維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。我々は、BTSC に高発現する分子が、脳腫瘍治療における重要な役割を担っているという仮説に基づき、これらをターゲットとした分子標的療法の開発を目指している。これまで我々は、MIF がグリオーマおよび BTSC に高発現しており、MIF を knockdown することによりグリオーマ細胞の増殖を抑制することを明らかにしている。本研究では MIF をターゲットとした脳腫瘍に対する分子標的治療の開発を目指して、グリオーマおよび BTSC における MIF

の機能解析を行う。

(1) MIF knockdown による細胞増殖抑制効果の分子メカニズムの解析

MIF は分泌因子であり、細胞膜レセプター CD74 を介してシグナル伝達される。一方、これまでの我々の解析結果から、グリオーマ細胞では核内で MIF が高発現していることから、MIF の細胞内作用に焦点をあて解析する。また、グリオーマ細胞における MIF knockdown による細胞増殖抑制効果は p53 を介していることが示唆される。そこで、本研究では MIF と p53 との相互作用を中心に解析する。

(2) BTSC 脳内移植マウスモデルに対する MIF をターゲットとした治療実験

将来の臨床応用を目指して、BTSC 脳内移植マウスモデルを用いて、*in vivo* での MIF 標的療法の有効性の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ細胞における MIF と p53 との相互作用の解析

MIF と p53 との結合性解析

グリオーマ細胞から核および細胞質タンパク画分を分離・抽出し、免疫沈降法により MIF と p53 の結合性を解析する。

MIF knockdown による p53 の DNA 結合能解析

siRNA を用いてグリオーマ細胞の MIF 発現を阻害後、核タンパクを抽出し、gel shift 法により p53 と標的 DNA との結合を解析する。コントロールとして control siRNA を transfection したグリオーマ細胞の核タンパクを用いる。

p53 と MIF の double knockdown によるグリオーマ細胞の増殖解析

グリオーマ細胞の MIF を knockdown すると増殖が抑制され、その効果には p53 が関与することが示唆されている。そこで、p53 と MIF を同時に knockdown した際のグリオーマ細胞の増殖解析を行い、p53 の関与を明らかにする。

(2) BTSC 脳内移植マウスモデルに対する MIF をターゲットとした治療実験

NOD/SCID マウス脳内 (線状体) に、分離し

た BTSC を移植し、マウス BTSC モデルを作成する。in vivo での siRNA の transfection 効率は非常に低いため、BTSC に感染効率に優れた lenti virus vector システムを用いる。MIF を knockdown するための MIF shRNA およびコントロールの shRNA を組み込んだ lenti virus vector を作成し、マウスモデルの脳腫瘍内へ定位的投与後の治療効果を解析する。

4. 研究成果

(1) グリオーマ組織由来 BTSC 細胞株の樹立

22 例の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 BTSC 細胞株の樹立に成功した。これら 3 つの細胞株は、多系統(グリア細胞、神経細胞、オリゴデンドログリア細胞)のマーカー陽性細胞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、神経腫瘍に似た組織像を呈する脳腫瘍を形成した。一方、他のグリオーマ組織由来の培養細胞の多くは、多系統への分化能を示したが、免疫不全マウス脳内へ移植しても腫瘍は形成されなかった。

以上、グリオーマ組織由来の長期培養可能な BTSC 細胞株を 3 種類樹立し、BTSC としての性質(多分化能、腫瘍形成能)を確認した。

(2) BTSC における MIF および p53 の発現

グリオーマ組織由来の長期培養可能な 3 つの BTSC 細胞株および他の 5 つの培養細胞、コントロールとして正常神経幹細胞およびアストロサイトにおける MIF の遺伝子発現を比較解析した。その結果、MIF は長期培養可能で高い腫瘍形成能を有する BTSC 細胞株において、他のグリオーマ組織由来培養細胞や正常細胞と比較して高い発現が認められた。

つぎに MIF および p53 の発現および細胞内局在を解析した。MIF は、3 つの BTSC 細胞株および 2 つのグリオーマ細胞株(wild-type p53 の U87MG、mutant-type p53 の T98G)において、神経幹細胞およびアストロサイトと比較して、細胞質および核内で高い発現が認められた。p53 は、上記の 3 つの BTSC 細胞株および 2 つのグリオーマ細胞株において核内発現を認め、BTSC 細胞株 2 種およびグリオーマ細胞株 1 種(T98G)において、細胞質内発現を認めた。一方、MIF の受容体である CD74 の発現を解析したが、BTSC および脳腫瘍組織において CD74 の発現は低かった。

以上、MIF はグリオーマ組織由来の培養細胞

胞の中で、長期培養可能で高い腫瘍形成能を有する BTSC に高い発現が認められた。また、MIF はグリオーマおよび BTSC の細胞質および核内で高い発現を認めた。

(3) MIF による p53 の腫瘍抑制機能阻害

siRNA を用いて MIF の発現を阻害することにより、wild-type p53 のグリオーマ細胞株 U87MG の細胞増殖が抑制された。siRNA MIF と siRNA p53 を同時に用いた解析により、この増殖抑制効果が p53 発現に依存すること、また免疫沈降解析により U87MG 細胞の核内で MIF と p53 が結合していることを明らかにした。さらに p53 の標的分子である p21 および BAX の活性、発現を解析したところ、MIF 発現阻害により、p21 および BAX の活性および発現が上昇した。flowcytometry による細胞周期および Caspase 3/7 活性を解析したところ、MIF 発現抑制により、G1 期停止および細胞死が誘導された。さらに p53 の DNA 結合配列(p21 プロモーター部位)を用いたゲルシフトアッセイにより、p53 の DNA 結合能を解析したところ、MIF 発現阻害により p53 の DNA 結合能が上昇した。

つぎに MIF 発現阻害により mutant-type p53 のグリオーマ細胞株 T98G においても細胞増殖が抑制されること、この増殖抑制作用は p53 発現に依存すること、さらに MIF は細胞質内 p53 と結合していることを明らかにした。mutant-type p53 の T98G において、MIF 発現阻害により、p53 の標的分子(p21, BAX)の活性に変化はなかったが、細胞死が誘導されることが明らかになった。

以上、グリオーマ細胞において MIF は核内および細胞質内 p53 と結合し、wild-type p53 のみならず mutant-type p53 の腫瘍抑制機能を阻害していることが示唆された。

(4) MIF 阻害による BTSC 腫瘍抑制

レンチウイルスベクターに組み込んだ MIF shRNA を用いて MIF 発現を阻害することにより、3 種類の BTSC 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。また、MIF 発現を阻害された BTSC は免疫不全マウス脳内に移植後、腫瘍は形成されなかった。さらに、BTSC 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 発現を阻害することにより in vitro のみならず in vivo において BTSC に対する抗腫瘍効果が示された。

(5) まとめ

MIF はグリオーマおよび BTSC において細胞

質および核内で高発現していた。MIF 発現を阻害すると、グリオーマ細胞の増殖が抑制され、この抑制効果は p53 発現に依存していた。wild-type p53 のグリオーマ細胞 U87MG において MIF は核内 p53 と結合しており、MIF 発現を阻害すると、核内 p53 の DNA 結合能が上昇し、標的分子である p21 や BAX の活性が亢進した。その結果、グリオーマ細胞は G1 期停止および細胞死が誘導された。一方、mutant-type p53 のグリオーマ細胞 T98G において MIF は細胞質内 p53 と結合しており、MIF の発現を阻害すると、p53 の核内標的分子の活性に変化はなかったが、細胞死が誘導された。このように、MIF は核内および細胞質内 p53 と結合し、wild-type p53 のみならず mutant-type p53 の腫瘍抑制機能を阻害していることが示唆された。さらに BTSC の MIF 発現を阻害すると、invitro での細胞増殖抑制のみならず、in vivo での抗腫瘍効果が誘導された。以上の結果から、MIF が BTSC の治療標的となる可能性が示された。

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2件)

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 2012 in press 査読有

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 Molecular Cancer 10(60)online journal 2011 査読有

[学会発表](計2件)

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、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(神奈川)

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 2011/9/27 瑠璃光(山代温泉)(石川県)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

深谷 雷太 (FUKAYA RAITA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60348670