

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659690

研究課題名（和文） 神経幹細胞の非対称分裂異常による発ガン機構の解析

研究課題名（英文） Effect of abnormalities in asymmetric cell divisions of neural stem cells on brain tumor initiation

研究代表者

清水 恵司 (SHIMIZU KEIJI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：70116044

研究成果の概要（和文）：悪性グリオーマ細胞や組織において、非対称分裂の異常が生じている可能性を検討するために幹細胞マーカー遺伝子のプロモーターを用いて幹細胞と分化細胞を識別する手技を確立した。また、複数の細胞分化に関連する遺伝子マーカーとフローサイトメトリーを用いることで悪性グリオーマ患者に由来する癌幹細胞や前駆細胞が多剤耐性遺伝子MDR1を高発現し、実際に抗癌剤によるDNA障害を生じ難いことを明確に示した。

研究成果の概要（英文）：A method for distinguishing a stem cell from a differentiated cell using stemness gene's promoter was developed to examine the abnormal asymmetrical cell division in malignant glioma cell cultures and tissues. By flow cytometric analysis using stem and precursor cell markers, it was revealed that glioma stem and precursor cells over-expressed MDR1 (multiple drug resistance 1) and exhibited low susceptibility to DNA damage by anti-cancer drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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

キーワード：脳腫瘍、エピジェネティクス、分化

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞が悪性脳腫瘍内に同定され、その悪性度への関連性や治療標的としての重要性が認識されている。また、この分野の研究から幹細胞などの未分化細胞が発ガン過程に寄与していることが明らかにされつつある。我々は、これまでに、悪性グリオーマ細胞株及び組織から癌幹細胞を分離、培養し、その薬剤耐性能や癌精巢抗原遺伝子の発現メカニズムを明らかにしてきた。これらの研究におけるエピジェネティックな因子の解析から悪性グリオーマは未分化細胞に起因することを提唱している。

神経幹細胞は、主に非対称分裂を生体内で行ない、神経系の細胞を供給している。正確

な神経幹細胞の非対称分裂には細胞の極性が重要であると同時に、がんにおいて細胞の極性の喪失は、腫瘍の悪性度を見極める上で未だに有用である。キイロシヨウジョウバエの変異体を用いた研究において、神経幹細胞の非対称分裂に異常が生じることで、染色体異常や浸潤能を伴う哺乳類でみられる癌細胞様の細胞が生じることが報告された。この現象が、哺乳類の神経幹細胞で再現されれば、「神経幹細胞のような細胞分裂の頻度が少ない細胞種からどのようなメカニズムにより発ガンするのか」といった疑問に答えうる可能性がある。マウスでは、*in vitro* できも細胞の極性を維持する機能をもつ Lethal giant larvae 1 (Lgl1) の欠失により、

神経前駆細胞は、細胞周期から exit 出来ず、過増殖を示すことが報告されている。つまり、正確な神経系細胞の分化には、細胞の極性が重要であり、その異常は細胞の増殖を亢進することが示唆されてきた。がん研究では、この極性の異常自体が組織レベルで観察されるが、腫瘍化後の増殖亢進の結果であるのか、発ガン時に影響を及ぼしたのかは未だ不明である。

2. 研究の目的

- ・悪性グリオーマに由来する幹細胞と分化細胞を標識する系の構築。
- ・悪性グリオーマ幹細胞の薬剤耐性に関わる因子の定量的評価。
- ・対称分裂、非対称分裂を識別する系の構築

3. 研究の方法

悪性グリオーマ細胞株と患者組織由来のがん幹細胞を多く含む Tumor sphere 培養では、N2 supplement、bFGF、EGF、LIF を添加した DMEM/F12 で培養した。幹細胞の分化誘導時には、血清を 10% 含む培養液で培養した。培養液フローサイトメトリーを用いて悪性グリオーマ細胞を神経系細胞系譜に沿って詳細に、分化レベルを解析出来る系を構築した。それぞれの培養細胞を固定、透過処理後、各抗体 (抗 CD133、抗 A2B5、抗 GFAP 抗体) を加えて一晩、4°C で反応させた。翌日、蛍光ラベルされた各種二次抗体と 1 時間、反応させた。死細胞は ethidium monoazide による染色で解析から除いた。抗癌剤に対する DNA 障害の感受性試験では、ヒストン H2AX (S139) のリン酸化 (γ H2AX) を認識する抗体を用いた。

悪性グリオーマで発現する幹細胞マーカー遺伝子 Nanog のプロモーター下流にレポーター遺伝子として蛍光タンパク EGFP を挿入したプラスミドベクターを作製し、グリオーマ細胞に遺伝子導入後、選択培養し、得られた薬剤耐性クローンを増やし、フローサイトメトリーによりその EGFP 陽性クローンをソートし、その分化レベル等を免疫組織化学染色により確認した。

患者サンプルや実験動物の取り扱いについては、高知大学倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

悪性グリオーマ細胞株及び患者組織から幹細胞を濃縮可能な Tumor sphere の培養と一般的な血清を用いた培養を行い、神経系細胞の分化マーカーを用いて、これらの培養細胞における分化レベルの階層構造を検討し

た (図 1)。グリオーマ細胞株 U87MG を通常通り培養する (U87) と大部分の細胞は、幹細胞マーカー CD133 とグリア前駆細胞マーカー A2B5 が共に陰性の分化細胞であった。これと比較して、U87MG の Tumor sphere culture (U87-TS) では、CD133 を発現する細胞が多く、A2B5 発現細胞も多く見られた。この幹細胞と前駆細胞と分化細胞の分布は、培養条件に影響を受けやすいが、Tumor sphere culture では、幹細胞が多いことが確認され、分化段階が前駆細胞に相当する細胞も同定出来た。この傾向は臨床サンプル由来の細胞でも同様であることが観察された。

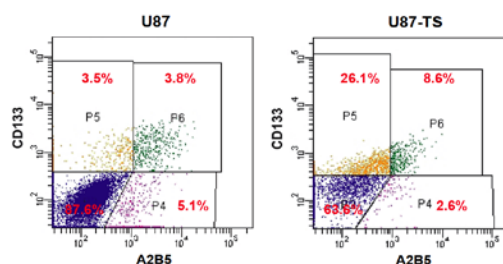


図 1. 体性幹細胞、グリア前駆細胞マーカーを用いた血清を用いた従来の培養法と Tumor sphere culture 法によって培養したグリオーマ細胞の分化レベルの比較検討

グリオーマ細胞株 U87MG、SNB19 とその Tumor sphere culture や臨床サンプル由来の初代培養細胞の Tumor sphere culture (GB3) の DNA 障害を誘導する抗癌剤に対する感受性を試験した。両細胞共に Tumor sphere culture した方が Etoposide、BCNU、Carboplatin に対して低い感受性を示した。次に、この抗癌剤に対する抵抗性が DNA 障害と関連しているかを検討するために、DNA 障害を受けた部位周辺に存在するヒストン H2AX の 139 番目のセリン残基のリン酸化 (γ H2AX) を指標に悪性グリオーマ細胞における DNA 障害の程度をフローサイトメトリーにより定量化した (図 2)。これらの腫瘍細胞では、抗癌剤処理をしなくても γ H2AX の foci が多数存在する細胞があることが観察された。Etoposide と Carboplatin でこれらの細胞を処理すると γ H2AX の foci と陽性細胞が濃度依存的に増加した。この γ H2AX 陽性率は、Tumor sphere culture した細胞では、通常培養と比較して半分以下であった。このことから未分化な細胞の多くは、抗癌剤によって DNA 障害を受け難いことが明らかになった。

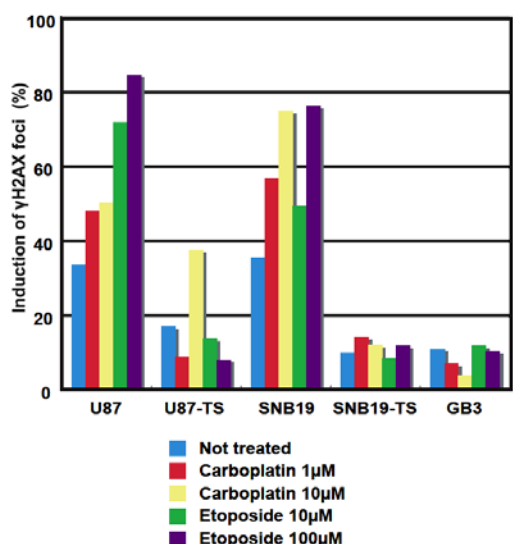


図2. グリオーマ細胞株とその Tumor sphere culture 細胞の抗癌剤に対する DNA 障害感受性の検討

我々は過去に、Multiple drug resistant 1 (MDR1) がグリオーマ幹細胞で高発現することを報告しているため、この腫瘍細胞の分化レベルを CD133 と A2B5 で同定し、MDR1 の発現様式を検討した。通常培養において MDR1 は CD133 陽性細胞で高頻度に発現しており、A2B5 でもある程度の細胞において発現が観察された。一方、分化細胞では、殆ど発現が観察されなかった。Tumor sphere culture においても同様に CD133 陽性細胞、A2B5 陽性細胞で MDR1 の高頻度な発現が観察された。しかしながら、分化細胞においても約半分程度の細胞が MDR1 を発現することが観察された。これらの結果から未分化なグリオーマ細胞に加え、分化細胞においても培養条件によっては MDR1 を発現することが明らかとなった。Tumor sphere culture した細胞の発現プロファイルは、腫瘍組織のものとよく類似していることが報告されていることから、実際の腫瘍組織では MDR1 が幹細胞以外でも発現している可能性が示唆された。この意義と発現様式の解析は今後の課題であり、薬剤抵抗性を克服するために重要であると考えられる。

悪性グリオーマ細胞や組織において、非対称分裂の異常が生じている可能性を検討するために幹細胞と分化細胞を識別する手技を確立した。幹細胞マーカー *NANOG* 遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク *EGFP* を組み込んだベクターを構築後、悪性グリオーマ細胞株への遺伝子導入により幹細胞を標識した。FACS により蛍光を発する細胞を分離し、このコンストラクトにより幹細胞と分化細胞が識別されているか各種分化細胞マーカーを用いて検証した。*EGFP* を発現する *NANOG* 陽性細胞は GFAP 陰性細胞であり、未分

化細胞である可能性が示唆された。今後、この細胞の脳内移植により腫瘍形成を行い、組織上で分裂様式の検討を行う予定である。

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)

- ① Yawata T, Shimizu K: Gene therapy strategies for treating brain tumors: Retroviruses are still good candidates for therapeutic vectors. *Open J Genet.*, 印刷中, 査読有
- ② Kawanishi Y, Tominaga A, Okuyama H, Fukuoka S, Taguchi T, Kusumoto Y, Yawata T, Fujimoto Y, Ono S, Shimizu K: Regulatory effects of Spirulina complex polysaccharides on growth of murine RSV-M gliomas cells through toll-like receptor 4. *Microbiol Immunol*, 査読有, 57: 63-73, 2013
- ③ Ohta M, Higashi Y, Yawata T, Kitahara M, Nobumoto A, Ishida R, Tsuda M, Fujimoto Y, Shimizu K: Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury. *Brain Res*, 査読有, 1490: 184-192, 2013
- ④ Nakabayashi H, Shimizu K: Stereoscopic virtual realistic surgical simulation in intracranial aneurysms. *Neurology India*, 査読有, 60:191-197, 2012
- ⑤ Yawata T, Maeda Y, Okiku M, Ishida E, Ikenaka K, Shimizu K: Identification and functional characterization of glioma-specific promoters and their application in suicide gene therapy. *J Neurooncol*, 査読有, 104: 497-507, 2011

[学会発表] (計 15 件)

- ① Shimizu K: Development of a high-titer retrovirus production system for glioma gene therapy. Joint Neurosurgical Convention 2013, 2013/1/29-2/3, Waikoloa, Hawaii, U. S. A.
- ② Shimizu K: Towards a clinical trial of gene therapy for malignant glioma using highly concentrated retrovirus solution. ESGCT 20th Anniversary Congress in Collaboration with the SFTCG, 2012/10/25-29, Versailles, France

- ③ 大田 学：頭部外傷後の軸索損傷と認知機能障害に対するエダラボンの効果の解析. 第13回日本分子脳神経外科学会, 2012/9/20-21, 熊本
- ④ 八幡 俊男：Multidrug-resistance (MDR-1) gene expression and susceptibility of immature glioma cells to drug-induced DNA damage. 第71回日本癌学会学術総会, 2012/9/19-21, 北海道
- ⑤ 東 洋一郎, エダラボンは頭部外傷による軸索損傷を阻止し、記憶障害を改善する. 第35回日本神経科学大会, 2012/09/18-21, 愛知
- ⑥ 川西 裕：Spirulina CPS を用いた悪性神経膠腫に対する免疫療法の検討. 第16回日本がん免疫学会総会, 2012/7/26-28, 北海道
- ⑦ 八幡 俊男：DNA 障害を指標とした悪性グリオーマ幹細胞の抗癌剤感受性の検討. 第22回日本サイトメトリー学会学術集会, 2012/6/29-30, 大阪
- ⑧ Shimizu K: Multidrug-resistance (MDR-1) gene expression in immature glioma cells. American Association for Cancer Research, Annual Meeting 2012, 2012/3/31-4/4, Chicago, IL, U.S.A.
- ⑨ Shimizu K: Brain tumor selective gene expression and therapy mediated by recombinant retroviruses containing the SSX4 promoter. ESGCT and BSGT Collaborative Congress 2011, 2011/10/27-31, Brighton, U.K.
- ⑩ 川西 裕：悪性神経膠腫のMGMT 発現評価に対する新たな試み. (社)日本脳神経外科学会第70回学術総会, 2011/10/12-14, 神奈川
- ⑪ 八幡 俊男：未分化なグリオーマ細胞における薬剤耐性遺伝子の発現. 第70回日本癌学会学術集会, 2011/10/3-5, 愛知
- ⑫ 東 洋一郎：てんかん発作による海馬歯状回神経新生異常に対する亜鉛投与の効果. 第34回日本神経科学大会, 2011/9/14-17, 神奈川
- ⑬ 八幡 俊男：悪性グリオーマ内在性の未分化細胞における薬剤耐性遺伝子の発現. 第21回日本サイトメトリー学会学術集会, 2011/6/25-26, 京都
- ⑭ 川西 裕：PCR in situ hybridization を用いたMGMT 発現評価の試み. 第29回日本脳腫瘍病理学会学術集会, 2011/5/20-21, 東京
- ⑮ Yawata T: Transcriptional targeting of retrovirus vector through the SSX4 tumor-specific promoter. American Society of Gene & Cell Therapy 14th

Annual Meeting, 2011/5/18-21, Seattle, WA, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 恵司 (SHIMIZU KEIJI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：70116044

(2) 研究分担者

八幡 俊男 (YAWATA TOSHIO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：40380323
東 洋一郎 (HIGASHI YOICHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：80380062