

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 7 日現在

機関番号：13301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791588
 研究課題名（和文） 遺伝子導入神経幹細胞移植モデルを使用した膠芽腫に対する新たな治療標的分子の探索
 研究課題名（英文） The identification of molecular targets for glioblastoma using mouse model transplanted transgenic neural stem cell
 研究代表者
 玉瀬 玲（TAMASE AKIRA）
 金沢大学・医学系・協力研究員
 研究者番号：10595458

研究成果の概要（和文）：

本研究では遺伝子導入神経幹細胞を移植したマウスグリオーマモデルを用いて、グリオーマ幹細胞に特異的な発現分子を探索した。GFP で標識したグリオーマ幹細胞(GFP 陽性細胞群)と陰性細胞群を抽出し、両群でマイクロアレイによる発現遺伝子プロファイルを作成した。GFP 陽性群で高発現を示す遺伝子を 50 種類リストアップした。このうちグリオーマ幹細胞に高発現する 2 つの有望な分子を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We explored the genes which overexpressed in glioma stem-like cells using the mouse glioma model transplanted transgenic neural stem cells. Glioma stem-like cells were labeled by Green Fluorescent Protein (GFP). The gene expression profiles of which cells are GFP positive or are GFP negative have been obtained by microarray data, respectively. Fifty candidate genes were picked up. Among them, two genes have been identified as promising genes.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：脳腫瘍学

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：グリオーマ、幹細胞、マウスモデル、標的分子、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

脳内原発の悪性脳腫瘍である膠芽腫は、未だなお確立した治療法がなく、その増殖能と浸潤能により予後絶対不良の腫瘍である。膠芽腫は周囲の正常脳に対して浸潤性に増殖する特徴があり、ヒトとしての高次機能を司る脳という臓器の性質を考えた時、手術で全部摘出することは不可能である。したがって開頭手術後に放射線・化学療法を加える集学的

治療を行うが浸潤腫瘍細胞からの再発は免れない。本腫瘍の予後を改善させるには膠芽腫の悪性形質を規定する分子の同定が極めて重要である。

正常組織には増殖能と分化能を合わせ持つ幹細胞を頂点とする階層性が存在するが、腫瘍組織にも同様の階層性が存在しごく一部の細胞が幹細胞のように振舞うとする概念が“がん幹細胞仮説”である。悪性グリオーマ

においては腫瘍内在幹細胞の抽出は他臓器がんに先駆けて成功し、研究領域が急速に拡大している。膠芽腫幹細胞については、現時点で様々な報告がなされているものの統一した見解は得られておらず混沌としており、研究分野としては黎明期と言える。腫瘍幹細胞は浸潤・転移能が極めて高くかつ放射線、抗がん剤に抵抗性を示すため、これが腫瘍再発の原因になっていると推測される。膠芽腫の高い浸潤能が難治であることの原因であることを鑑みた時、集学的治療後に残存し腫瘍再発の原因となる腫瘍幹細胞を制御することが根治につながると考えられる。膠芽腫幹細胞悪性形質の分子機構を明らかにすることは膠芽腫のバイオロジーを理解する上で急務であると言える。

我々は正常組織幹細胞で高発現している Nucleostemin (NS) 遺伝子のプロモーターの下流で発光遺伝子の Green Fluorescent Protein (GFP) を発現するトランスジェニックマウス (NS-GFPマウス) を樹立した。これは個体内でNSの発現誘導シグナルを可視化して正常組織幹細胞を標識することができる独創的なシステムである。我々はこのNS-GFPシステムを用いて革新的な悪性グリオーママウスモデルを確立した (Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)。我々の作成したNS-GFPシステムは、新しい正常組織幹細胞マーキングシステムである。フローサイトメトリーでは標識できない核内蛋白であるNSの発現をGFPで代用することで生存細胞において観察できる点で非常に価値が高い。我々はこのNS-GFPシステムを脳腫瘍マウスモデルにおいて適用し tumor-initiating cells を GFP 標識にて分離抽出する点が非常に独創的である。具体的にはがん抑制遺伝子である p16Ink4a/p19Arf の欠失マウスを用いて幹細胞に発現する NS をマーカーとして神経幹細胞を抽出する。これにレトロウイルスをベクターとして活性化型 K-Ras を導入し、マウス脳に移植するものである。本モデルにおいて GFP 陽性細胞群 (glioma stem-like cells) は腫瘍の辺縁部、特に血管周囲に位置し、腫瘍の増殖・正常脳への浸潤に強く関与することが示唆された (下図)。

グリオーマ幹細胞の分子機構の研究は始まったばかりで解析途上にあり不明な点が多い。これを明らかにすることは神経膠腫のバイオロジーを理解する上で急務であると言える。

近年のがん治療において、がん細胞に特異的に発現するタンパクを標的とした分子標的療法は大きな成功の一つであることは明白である。これまでに複数の分子標的薬剤が開発されており、肺がんや白血病に対する分子標的療法が確立され奏効しているが、脳腫瘍治療においては確立されていない。とりわけ再発の原因となっているグリオーマ幹細胞をターゲットとした分子標的療法は世界的に見ても例がない。浸潤細胞の多くはグリオーマ幹細胞である可能性が高く、グリオーマ幹細胞の悪性形質に関わるタンパクは分子標的療法のターゲットとして考えた場合に妥当かつ合理的である。従って今回申請するプロジェクトから得られる結果は分子標的薬剤の開発を経て膠芽腫に対する臨床応用に直結する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が開発した悪性グリオーママウスモデルにおける glioma stem-like cells に特徴的な発現分子について解析を進め、その機能を阻害することで腫瘍増殖浸潤抑制効果を示すような分子を同定することにより膠芽腫の新たな治療標的分子を探索することにある。本研究から得られる結果を「グリオーマ幹細胞に対する分子標的療法の確立」の礎として悪性グリオーマの革新的治療に結実させたい。

3. 研究の方法

NS-GFP システムを用いたマウスグリオーマモデルから GFP で標識した glioma stem-like cells (GFP^{high} 群) と GFP^{low} 群を細胞分離器 FACS を用いて抽出した。tumor-initiating cells は GFP^{high} 群に多く存在することが正常マウスへの二次的な移植の結果によりすでに分かっている。さらに GFP^{high} 群がグリオーマ幹細胞としての性質を有し、GFP^{low} 群で有しないことを、neural stem cell 培地での sphere 形成と幹細胞マーカーである Nestin, Sox2, Musashi の発現により確認した。確認後、両群でマイクロアレイ解析のための RNA を抽出した。マイクロアレイによる発現遺伝子プロファイルを作成した。このリストを両群間で比較することにより GFP^{high} 群で高発現を示す遺伝子を 50 種類リストアップした (下表)。

金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：10595458

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし