

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791601

研究課題名(和文)脳腫瘍幹細胞およびニッチにおけるキヌレニン経路の阻害効果

研究課題名(英文)The inhibition effects of the Kynurenine pathway on brain tumor stem cells and its niche.

研究代表者

宮崎 健史 (Miyazaki, Takeshi)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：00346397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織学的検討から膠芽腫組織内においてIndoleamine 2,3 dioxygenase(IDO)発現細胞が、膠芽腫を特徴づける組織形態を構成する細胞とoverlapすることが示唆された。また浮遊細胞塊法にて濃縮培養されたsphere(脳腫瘍幹)細胞では、sphere細胞を血清刺激して得た分化型腫瘍細胞よりもIDO遺伝子発現レベル、酵素活性レベル、双方において高い状態であることも示唆された。これらの結果は、膠芽腫においてIDO強発現細胞、すなわち脳腫瘍幹細胞を標的とする治療戦略が、IDO阻害効果による自己免疫寛容状態からの解放作用と重なり極めて効果的である可能性を支持するものである。

研究成果の概要(英文)：Immunohistological examination revealed that Indoleamine 2,3 dioxygenase(IDO) positive cells in glioblastoma(GBM) tissue overlap the cells which construct the characteristic structure indicating GBM. The sphere cells (brain tumor stem cells: BTSC) enriched by the sphere culture method from the GBM patient showed high IDO reactivity on not only level of gene expression but also the enzyme activity compared with differentiated cells from sphere cells by serum stimulation. These data support IDO targeted strategy for BTSC in GBM treatment will be highly effective coupled with the fact that IDO inhibition may restore host's immune response against GBM.

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：glioblastoma brain tumor stem cells Kynurenine pathway

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性神経膠腫 (glioblastoma: GBM) は原発性脳腫瘍における主要死亡原因である。1999年米国FDAに認可された第2世代アルキル化剤であるTemozolomideは今日におけるGBMに対する第一選択薬であるが、その延命効果は大きな進歩といえども僅か2.5カ月であった。EGFR阻害薬、VEGF阻害薬など、今日ではさらに数多くの分子標的薬が開発されTemozolomideとの併用を含めた臨床治験が進められているものの、GBM根治に向けてbreak throughを迎えるに到っていない。一方2003年に報告された脳腫瘍幹細胞の存在はGBM根治に向けての新たな光明となりうると思われた。すなわちこれまで理論上の存在であった腫瘍構成細胞群 hierarchyの頂点に君臨する腫瘍幹細胞 (brain tumor stem cells: BTSC) (CD133, Sox2, Nestinなど神経幹細胞マーカー陽性で、あらゆる系統の腫瘍細胞への多分化能と自己複製能をもち、免疫不全マウスへの移植により同様の腫瘍塊を形成可能な細胞)を標的とし、これを根治することができれば、GBMもすなわち根治できるという考えである。しかしながらその後の研究により、これらのマーカーが陰性である細胞群にも腫瘍形成能をもつ細胞が存在すること、分化した細胞が再び幹細胞性質を獲得しえること、などが報告され、今日ではその特異的マーカー不在による混沌化の様相を呈している。これらの事実は、BTSCのみを標的とした治療法だけでは、腫瘍を支持する周辺環境を含めた複雑な生体反応の結果として存在する実際のGBM治療にあてはめることの限界を示しているといえよう。

(2) GBM、さらには腫瘍幹細胞の性質はそれを取り巻く環境 (niche) との関係で維持されると推察されている。実際にGBMにおいて腫瘍栄養血管床にBTSCが局在し、内皮細胞からのVEGFがBTSCの増殖に寄与している事実や、低酸素により誘導されるHIF1がBTSC維持に寄与している事実が報告されており、もはやGBM根治のためにはGBMの局所環境を含めた包括的な標的設定が不可欠であることを物語っている。Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) は元来必須アミノ酸であるTryptophanを補酵素NADへ代謝するKynurenine経路の律速酵素であるが、胎盤や腫瘍の局所環境において過剰発現しTryptophan (Trp) 枯渇とKynurenine経路中間代謝産物 (Kyn, 3HK, 3HA)

の蓄積により宿主T細胞性免疫反応を抑制する免疫抑制因子として注目されている。我々はこれまでに数種のGBM細胞株において、GBM自身にこのIDOが発現し、IFNによる刺激により強いIDO活性を発揮しうること、IDOがストレス下において腫瘍細胞保護的に作用すること、さらにGBM自身が自身の微小環境を変化させうる可能性を報告してきた。しかしながら実際の患者の組織内において、あるいは動物腫瘍モデル内においてIDOがどのような局在をしどのような効果をもたらしているのかについては未知数のままである。仮にIDOがBTSCにおいてより強く発現し、また実際の腫瘍塊内での局在が腫瘍栄養血管内皮細胞や壊死虚血 (pseudopalisading) に隣接しているとしたなら、IDOの阻害はBTSCの増殖抑制効果のみならず、局所環境におけるtryptophan維持に寄与し、引いてはT細胞性免疫反応を復活させうる可能性を秘めていることになる。

2. 研究の目的

BTSCにおけるIDOの果たす役割を解明し、その阻害効果が治療に役立つかどうかの基礎的知見を収集する。具体的には

- ・BTSC自身におけるIDOの発現レベルとその活性。
- ・IDO阻害が及ぼすBTSCの自己複製能と増殖能への効果。
- ・IDO阻害時のGBMにおける遺伝子 (EGFR, 幹細胞マーカー、等) 発現の変化。
- ・GBM組織におけるIDOの発現の有無やその局在。たとえば壊死層周囲か、腫瘍血管床周囲か、など。
- ・GBM組織におけるBTSCとIDO発現細胞 (これはBTSCである可能性も含めて) の位置関係。
- ・GBM細胞株、およびBTSC移植マウス脳腫瘍モデルを用いてのIDO阻害によるin vivoでの治療効果を解明する。

3. 研究の方法

(1) BTSC自身におけるIDOの発現レベルとその活性評価：患者由来GBMを浮遊塊形成法にて腫瘍幹細胞集団を濃縮、培養し、IDOレベルをPCR (real time等)、Western blot、Immunocytochemistryにて評価。また活性については培養液中のTrpやその代謝産物をtandem mass spectrometryにて測定し評価する。また一方で同様の評価を分化細胞集団 (腫

瘍幹細胞集団を血清添加刺激により分化させることで作成)についても行い比較する。

(2) IDO 阻害が及ぼす BTSC の自己複製能と増殖能への効果判定: IDO 競合阻害剤である 1 methyl-L-tryptophan(1MT)などの IDO 阻害剤を添加、あるいは small interfering RNAs of IDO を作成し、それらによる増殖活性の変化を測定する。また Sphere forming assay を用いて自己複製能力を評価する。

(3) IDO 阻害時の GBM における遺伝子(EGFR、幹細胞マーカー、等)発現変化の評価: IDO 阻害剤添加時において immunocytochemistry にて評価、あるいは cell lysate を作成し Western blot にて評価する。また RT-PCR にて messenger レベルでの評価を行う。

(4) GBM 組織における IDO の発現場所、局在。たとえば壊死層周囲か、腫瘍血管床周囲か、などの評価: GBM 組織より Tissue microarray を作成、これを IDO、HIF1-、VEGF 当の抗体を用いて免疫染色しその局在を比較する。

(5) GBM 組織における GBM 幹細胞と IDO 発現細胞(これは GBM 幹細胞自身である可能性も含)の位置関係の検討: IDO と CD133、Sox2、Nestin、CD15 などの幹細胞 marker の染色により GBM 組織内において IDO 発現細胞が BTSC と同一か否かを評価する。

4. 研究成果

(1) BTSC 自身における IDO 発現レベルとその活性

まず患者由来 GBM 組織片から脳腫瘍幹細胞株を sphere 塊法にて樹立した(図 1a) またその細胞を血清刺激することで分化型細胞を誘導した(図 1b)。

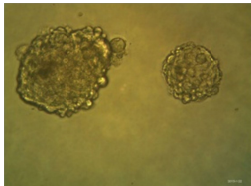


図 1a

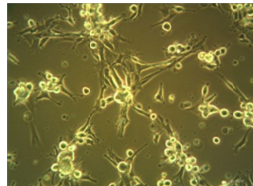


図 1b

この細胞を用いて IFN 100(IU/ml)刺激 24 時間反応下での Trp 消費と Kyn 産生量を Tandem mass spectrometry にて測定し、IDO 活性を調べたところ、positive control として使用した既存商業ベース GBM 細胞株

(LN229)と比較すると、幹細胞、分化細胞状態ともに極めて IDO 活性が低いことが示された(図 2)。

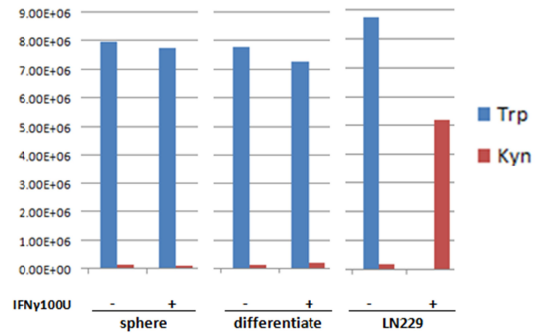


図 2

一方で sphere(幹細胞)状態と分化細胞状態における IFN 刺激時の IDO 活性の比較に注目すると、幹細胞状態の方が同条件下で Kyn の産生量が多く、IDO 活性が高い結果が示された(図 3)。

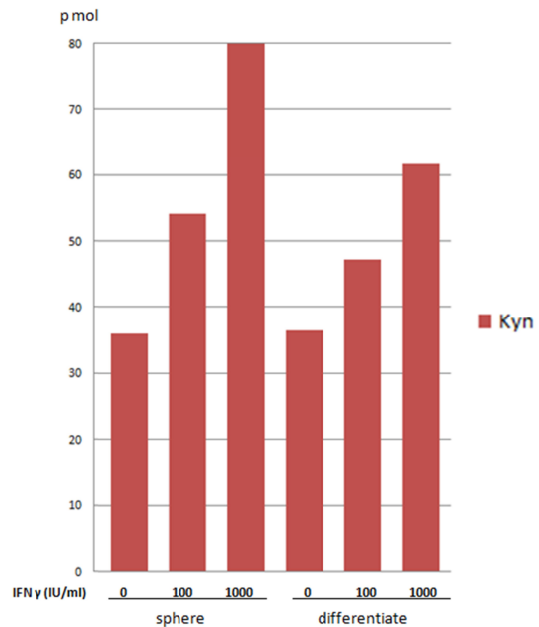


図 3

さらにこの際の IFN に対する幹細胞状態と分化細胞状態での遺伝子発現レベル変化を cDNA マイクロアレイにて網羅的に解析したところ、IDO 遺伝子の発現レベルについては幹細胞状態の方が分化状態に比べて約 10 倍発現が上昇していた。

(2) GBM 組織における IDO の発現の意義

Tissue Microarray(Normal(N):8, Diffuse astrocytoma(DA):25, Anaplastic astrocytoma(AA):8, Glioblastoma(GBM):7,

total 48 sample を含む (図 4)) を用いて

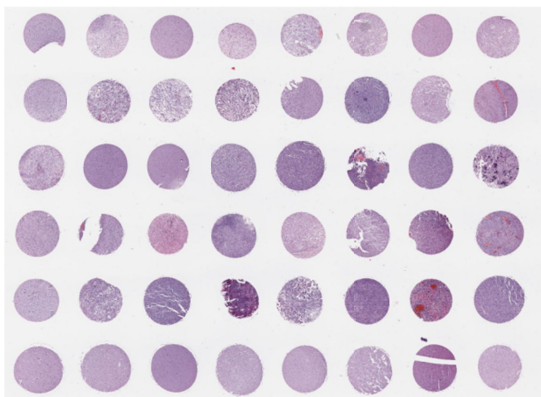


図 4

IDO、および幹細胞マーカーの一つである Nestin による免疫染色を施行し、各抗体の陽性率を 0(陰性) ~ 4(強陽性) 点に 4 段階評価、score 化し平均値を比較した。Tissue microarray 上、Nestin(+)score は N=0.25、DA=1.12、AA=2.00、GBM=3.14 と grade とともに上昇したが、DA の中でも 0~3 点がまちまちに見られた。一方で IDO(+)score は N=0、DA=0.04、AA=0.5、GBM=1.71 となったが、実際には IDO 陽性であった DA は 25 例中 1 例、AA は 8 例中 1 例のみであり、ほぼ GBM 特異的に IDO 強陽性が認められる結果となった。

(3) GBM 組織における GBM 幹細胞と IDO 発現細胞の位置関係

IDO 陽性細胞は pseudopalisading 部に強い局在が認められた。この傾向は Nestin や Sox2 陽性細胞の分布と一致すると同時により顕著であった (図 5)。一方、腫瘍血管周囲におい

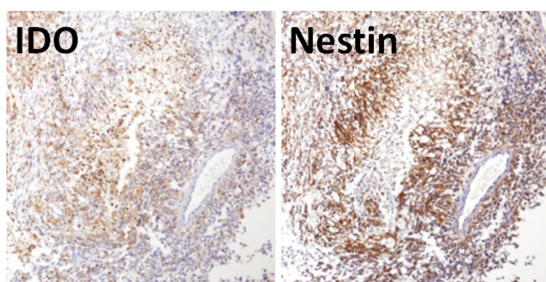


図 5

ては強い局在が認められる例と認められない例がまちまちであった。

以上の結果からは、実際の GBM 患者組織内において IDO 発現細胞がいわゆる GBM を特徴づける組織形態を構成する細胞と overlap することが示唆された。さらに sphere (幹細胞) における IDO 活性が分化細胞よりも遺伝子レ

ベル、酵素活性レベル、双方において高い可能性も示唆された。これらの結果はいずれも GBM 治療において IDO 強発現細胞、すなわち腫瘍幹細胞 (BTSC) を標的とする戦略が、効果的である可能性を支持するものであり、今後は IDO 阻害効果の判定を経て in vivo での評価へと発展させることで、あらたな GBM 治療選択肢の樹立が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

宮崎健史ら、神経膠腫における Indoleamine 2,3-dioxygenase 発現と局在、第 30 回日本脳腫瘍学会、2012 年 11 月 26 日、広島

宮崎健史ら、グリオーマにおける Indoleamine 2,3-dioxygenase 発現と局在の意義、第 71 回日本脳神経外科学会総会、2012 年 10 月 18 日、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕なし。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 健史 (MIYAZAKI, Takeshi)
島根大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 00346397