

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592167

研究課題名(和文) グリオーマにおけるSHHと遊走能の関係

研究課題名(英文) Role of sonic hedgehog signaling in migration of malignant glioma

研究代表者

内田 裕之(Uchida, Hiroyuki)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：80404482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はグリオーマ幹細胞株の樹立およびSHH pathwayがグリオーマ幹細胞の遊走に与える影響について評価することを目的とした。悪性神経膠腫組織から自動磁気細胞分離装置にてCD133陽性細胞を抽出、培養しtumor sphereを形成させた。悪性グリオーマの遺伝子解析ではほぼ全例にSHH pathwayの発現を認め、またSHHはstemnessの維持および遊走能の亢進に関与していることが示唆された。また、継代培養する過程において培養皿に接着し接着細胞として増殖する細胞群が確認されたが、これらにおいては通常の悪性神経膠腫細胞株よりも豊富にCD133陽性細胞が存在することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：This study was intended to establishment of the glioma stem cell line and evaluate the influence of SHH pathway to migration of the glioma stem cells. CD133-positive cells in malignant glioma tissue were extracted using an automagnetic cell separator and tumor spheres were obtained. Gene expression of SHH pathway was detected in almost cases of malignant glioma. It was suggested that SHH participated in maintenance of stemness and migration. In adherent cells confirmed in a process of subculture, CD133-positive cells existed more than in normal malignant glioma cell lines.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Glioma Cancer stem cell CD133 migration Sonic hedgehog

1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな腫瘍における腫瘍幹細胞が同定されているが、その中でもグリオーマに存在する幹細胞も同定されており、腫瘍中に存在する CD133 陽性細胞が腫瘍幹細胞として考えられている。実際にヒト悪性脳腫瘍から抽出された CD133 陽性腫瘍幹細胞を NOD/SCID mouse に移植すると元の組織型と同様の脳腫瘍を形成したという報告があり、グリオーマにおける CD133 陽性腫瘍幹細胞は Tumor initiating cell としての地位を確立しつつある。悪性グリオーマにおける腫瘍幹細胞は、細胞表面マーカーである CD133 蛋白質にて分離することが可能であり、その細胞の薬剤耐性能や放射線耐性能についての報告がなされている。現在当教室でも悪性グリオーマにおける腫瘍幹細胞を CD133 抗体-マグネットビーズによって単離し、同細胞の薬剤耐性、アミノ酸代謝、遊走能等に関する基礎的研究を行っている。

一方、Sonic hedgehog (SHH) signaling pathway は胎生期の分化・正常発達に不可欠な経路であり、また幹細胞においては stemness の維持に関与している。そして、その経路の異常な活性化が種々の悪性腫瘍において確認されており、その発生に関与しているとされる。更に近年には endothelial progenitor cell あるいは enteric neural crest cell において、SHH signal により progenitor / stem cell の遊走能が上昇し、そのメカニズムのひとつとして PI 3-kinase / AKT pathway を介する SHH pathway が関与していることが報告されている。

また、神経幹細胞が豊富とされる subventricular zone に接するグリオーマ病変は浸潤性が高く、その浸潤に幹/前駆細胞の役割は重要であることが報告されており、以上のことより我々は悪性グリオーマの浸潤に CD133 陽性細胞が大きく関与し、その遊走能、浸潤能に SHH signaling pathway が関与しているのではないかという仮説を立て、SHH signaling pathway が悪性グリオーマ中の CD133 陽性細胞の遊走能、浸潤能にいかに関わっているかを分子生物学的に解明し、最終的にはその経路を阻害することにより CD133 陽性細胞の遊走能、さらには腫瘍浸潤を抑制できるかどうかの研究を行いたいと考えている。

2. 研究の目的

ヒトグリオーマ幹細胞株の樹立および SHH signaling pathway に関する分子プロファイルの解析、SHH signaling pathway の役割を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 治療目的の腫瘍摘出手術にて切除されたヒト悪性グリオーマ組織を迅速に、かつ無菌的に Neural tissue dissociation kit (ミルテニー社) を用いて細胞浮遊液とし、抗 CD133 抗体 - マイクログラネットビーズと反応させ、ミルテニー社の自動磁気細胞分離装置である Auto MACS を用いて CD133 陽性細胞および陰性細胞に分離し抽出した。

得られた CD133 陽性細胞を 20 ng/ml EGF、20 ng/ml bFGF、20 ng/ml LIF、N2 supplement を含む無血清培地 (DMEM-F12) にて初代培養し tumor sphere を形成させた。その後も同条件下で継代培養をおこなった。

また、SHH タンパク 10 µg/ml あるいは抗 PATCHED 抗体 2.5 µg/ml の存在下に sphere 形成能の差を解析した。

(2) ヒト悪性グリオーマ 16 症例 (glioblastoma 9 症例、giant cell glioblastoma 1 症例、anaplastic oligodendroglioma 5 症例、anaplastic astrocytoma 1 症例) の腫瘍組織より CD133 陽性細胞および陰性細胞を分離し mRNA を抽出、cDNA ライブラリーを作製し、SHH signaling pathway に関与する分子である PATCHED (PTCH) および SMOOTHENED (SMO) をターゲットに RT-PCR を用いて発現を解析した。

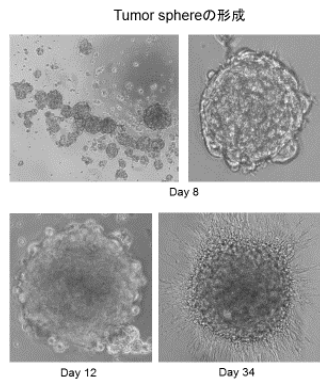
(3) CD133 陽性細胞において、SHH タンパクを chemoattractant とし、chemotaxis chamber を用いて migration assay をおこなった。Chemotaxis chamber の upper well から membrane を通過して lower well へ移動した細胞をカウントし、control との比をとった。

また、SHH signaling pathway 阻害剤として Cyclopamine を、PI3 kinase 阻害剤として LY294002 を用い migration に与える影響を検証した。

4. 研究成果

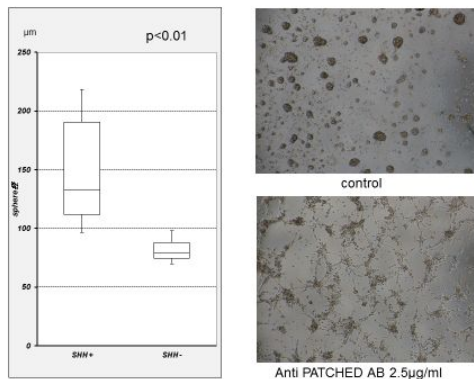
(1) ヒト悪性グリオーマ切除組織より抽出した CD133 陽性細胞のプライマリーカルチャーにおいて、sphere を形成しながら増殖する細胞群が 3 症例において得られ、培養を継続すると sphere 径を増大させながら増殖した (図 1)。それらの細胞群は、その後の継代培養においても sphere 形成能を失わず、また前述の特定の増殖因子の存在する無血清条件の培地にて増殖能を保持し続ける特徴を有していた。

図 1



更にそれらの細胞群においては、SHH タンパクの存在下 (10 µg/ml) では個々の sphere 径の有意な増加を認め(図 2 左)、また SHH の受容体である PATCHED に対する抗体の存在下 (2.5 µg/ml) では sphere 形態を失い、接着細胞へと分化した形態で増殖した(図 2 右)。このことから SHH signaling pathway がグリオーマ幹細胞においても stemness の維持に関与していることが示唆された。

図 2



(2) CD133 陽性/陰性細胞における SHH signaling pathway の遺伝子発現を解析したところ、16 例中全例において、PATCHED and/or

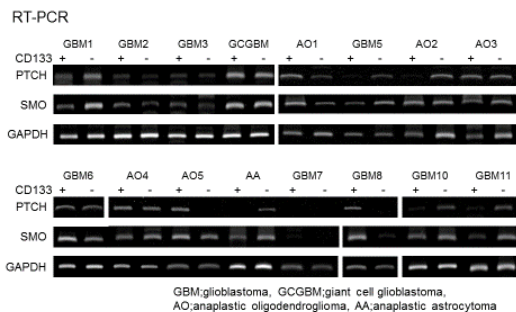
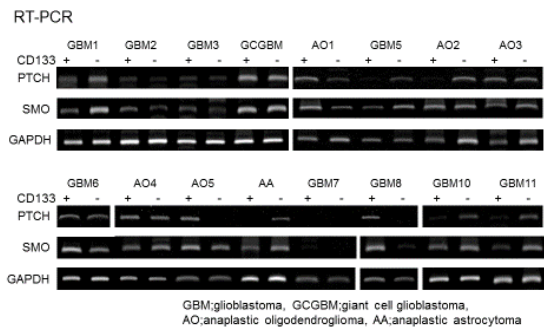


図 3



(3) CD133 陽性細胞における chemotaxis chamber を用いた migration assay では、SHH タンパクの存在下では遊走能が亢進し、また SHH signaling pathway 阻害剤である cyclopamine および PI3-kinase/AKT pathway 阻害剤である LY294002 の存在下では遊走能が低下した(図 4)。このことから SHH signaling pathway を介した遊走においては PI3-kinase/AKT pathway が関与していることが示唆された。

図 4

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

MRI における髄膜腫辺縁 T2 緩和時間延長帯についての検討

内田裕之

第 38 回日本脳神経 CI 学会総会・ウインク あいち (愛知県名古屋市)

2015 年 2 月 14 日

単一施設における central neurocytoma
の治療成績

内田裕之、細山浩史、米澤 大、山畑仁志、大吉達樹、花谷亮典、平野宏文、時村 洋、有田和徳、八代一孝

日本脳神経外科学会第 73 回学術総会・グ
ランドプリンスホテル(東京都港区)

2014 年 10 月 10 日

単一施設における central neurocytoma
の治療成績

内田裕之、細山浩史、米澤 大、山畑仁志、大吉達樹、花谷亮典、平野宏文、時村 洋、有田和徳、八代一孝

第 19 回日本脳腫瘍の外科学会・東京ド
ームホテル(東京都文京区)

2014 年 9 月 12 日

Collagen deposition makes MRI T2
hypointensity of metastatic brain
tumors from gastric and colonic cancers
Hirano H, Yonezawa H, Habu M, Kishida S,
Fujio S, Arita K

82nd AANS Annual Scientific Meeting (San
Francisco, USA)

2014 年 4 月 5 日

悪性リンパ腫, 悪性グリオーマの術中迅
速診断における問題点

平野宏文、花谷亮典、大吉達樹、米澤 大、内田裕之、湯之上俊二、羽生未佳、花田朋
子、時村 洋、有田和徳

第 31 回日本脳腫瘍病理学会・KFC Hall 国
際ファッションセンター(東京都墨田区)

2013 年 5 月 25 日

Concomitant bevacizumab therapy for
recurrent malignant glioma: a
single-institution experience

Uchida H, Yonenaga M, Hirano H, Hosoyama
H, Kubo F, Hanada T, Yonezawa H, Fujio
S, Sugata S, Arita K

Joint Neurosurgical Convention 2013
(The 6th Mt. Bandai Symposium for
Neuroscience and the 7th Pan-Pacific
Neurosurgery Congress)(Waikoloa, USA)

2013 年 2 月 1 日

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ns/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田 裕之 (Uchida Hiroyuki)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・特
任助教

研究者番号：80404482

(2)研究分担者

平野 宏文 (Hirano Hirofumi)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講
師

研究者番号：00264416

湯之上 俊二 (Yunoue Shunji)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客
員研究員

研究者番号：20404478

有田 和徳 (Arita Kazunori)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教
授

研究者番号：90212646