

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462260

研究課題名(和文)脳腫瘍幹細胞とニッチにおけるインドールアミンジオキシゲナーゼの阻害効果

研究課題名(英文)The inhibitory effect of indoleamine 2,3 dioxygenase on brain tumor stem cells and 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織学的検討では膠芽腫(GBM)組織内Indoleamine 2,3 dioxygenase(IDO)陽性細胞はGBMに特徴的である増生した血管内皮やpseudopalisading周辺に集簇した。血管内皮細胞の多くはIDO陽性/Sox2陰性細胞で、それらの中にはmicrogliaを示唆するIba1陽性細胞の存在が示唆された。一方IDO陽性/Sox2陽性細胞は血管周囲に存在した。脳腫瘍幹細胞(BTSC)と分化細胞(DC)でのIFN刺激時のpathway解析では、BTSCの方がDCよりpathway変動が大きく、特にdown regulationされるpathwayで違いが大きかった。

研究成果の概要(英文)：Immunohistological examination revealed that Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) positive cells in glioblastoma(GBM) tissue constellate around the characteristic structure indicating GBM (microvascular proliferation, endothelial proliferation, pseudopalisading). The majority of those endothelial cells are IDO positive / Sox2 negative cells and some of them may be Iba1 positive cells which indicate microglia. On the other hands, IDO positive / Sox2 positive cells constellate around the vascular structure. The pathway analysis of BTSC vs DC under IFN stimulation indicate BTSCs are more sensitive to the stimulations, especially on down regulation side.

研究分野：医歯薬学

キーワード：glioblastoma brain tumor stem cells IDO 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 brake 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、これを根絶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うること、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。一方、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う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、さらには局所環境因子により BTSC 自身が血管内皮細胞へ分化し腫瘍血管形成に寄与している事実が報告されており、もはや GBM 根絶のためには 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。

(2) Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) は元来必須アミノ酸である Tryptophan を補酵素 NAD へと代謝する 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、近年米国にて難治性固形癌患者への IDO 阻害剤の臨床治験が開始されている。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 がどのような局在で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、ひいては 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

(1) BTSC 自身における IDO の発現レベルとその活性。

(2) IDO 阻害が及ぼす BTSC の自己複製能と増殖能への効果。

(3) IDO 阻害時の GBM における遺伝子 (EGFR、幹細胞マーカー、等) 発現の変化。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 新規 IDO 阻害薬の探索。
が挙げられる。

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)、microarray、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 により 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 と分化誘導した腫瘍細胞 (Differentiated cells) における IFN 刺激時の網羅的 pathway 解析

BTSC と DC における IFN 刺激時の IDO 遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイにて網羅的に解析し、DC に比較し SC において IDO 発現が約 10 倍上昇していることを見出したが、さらにどの pathway が変動してい

るのかマイクロアレイデータを用いて pathway 解析を行った (Fig.1)。BTSC を IFN 刺激したとき有意に up regulation した pathway 数は 33、DC で 12。そしてその 12 の pathway は BTSSC のそれと全て共通していた。逆に有意に down regulation した pathway 数は BTSC で 4、DC で 3。しかしその 3 つの pathway は SC におけるそれと共通したものはなかった。この結果は SC の方がより敏感かつダイナミックに外的要因に対して変化しうることを、さらに down regulation される pathway においてより BTSC の特徴が表れてくることを示した。

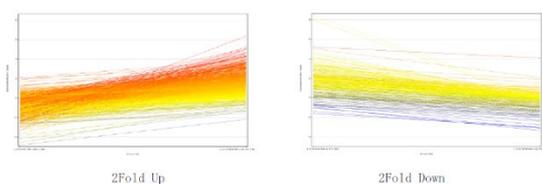


Fig.1

(2) GBM 組織における BTSC と IDO 発現細胞の位置関係

これまでの研究により IDO 陽性細胞は GBM 組織内において pseudopalisading、腫瘍血管周囲、に集簇し、そのパターンが Sox2 や Nestin などの幹細胞マーカー発現細胞の分布と類似することを見出した。そこでさらに IDO と Sox2、2 つのマーカーについて蛍光二重免疫染色を行ったところ、腫瘍血管を構成する細胞はほぼすべて IDO 陽性細胞であり、その周辺に IDO/Sox2 共に陽性細胞、IDO のみ陽性細胞、Sox2 のみ陽性細胞、IDO/Sox2 共に陰性細胞、が取り囲むように局在していた。また、pseudopalisading 部においては、壊死側はほぼ IDO 陽性細胞で構成され、周辺に IDO/Sox2 共に陽性細胞、

IDO のみ陽性細胞、Sox2 のみ陽性細胞、IDO/Sox2 共に陰性細胞、それぞれが散在していた (Fig.2)。

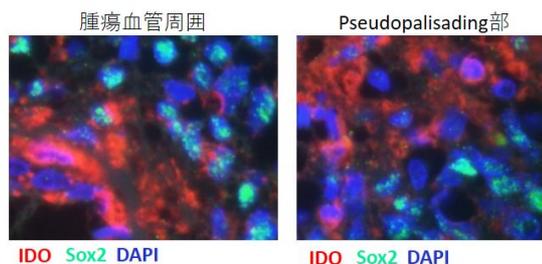


Fig.2

IDO 陽性で Sox2 陰性である腫瘍構成細胞として、分化した GBM 細胞や侵入してきた microglia などの可能性が想定されたため、次にまず microglia のマーカーである Iba-1 抗体を用いて Iba-1 陽性細胞が GBM 組織内においてどのような分布をしているのか免疫染色を行ったところ、やはり腫瘍血管周囲に顕著であった。またさらに増殖肥厚した腫瘍血管構成細胞の中にも Iba-1 陽性細胞がみられた (Fig.3)。今後 IDO/Iba-1、IDO/GFAP、共発現細胞についても検討をすすめる。

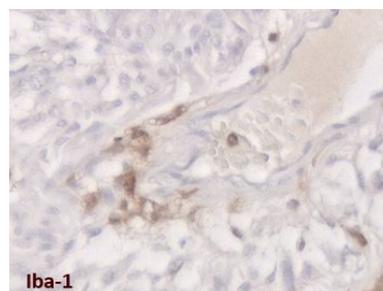


Fig.3

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

〔学会発表〕(計3件)

1. 宮崎健史ら、Glioblastoma 局所環境における Indoleamine 2,3-dioxygenase 発現細胞の分布と性質、第74回日本脳神経外科学会総会、2015年10月14日、札幌、ロトイン札幌
2. 宮崎健史ら、膠芽腫における Indoleamine 2,3-dioxygenase の発現様式、第33回日本脳腫瘍病理学会、2015年5月29日、香川、JRホテルクレメント高松
3. 宮崎健史ら、Glioblastoma 幹細胞と Indoleamine 2,3-dioxygenase 活性の関係、第73回日本脳神経外科学会総会、2014年10月9日、東京、グランドプリンスホテル新高輪

〔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・講師

研究者番号：00346397