

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591685

研究課題名（和文） がん幹細胞の生み出す多様性の原因解析と免疫療法への応用

研究課題名（英文） Contribution of cancer stem cells to tumor heterogeneity; A search for cancer stem cell-specific immunogen.

研究代表者

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

研究成果の概要：

癌幹細胞は、悪性腫瘍を根治するために重要な標的として考えられている。本課題では、悪性脳腫瘍の細胞株から分離培養した癌幹細胞が、薬剤を細胞内から排出することで化学療法に耐性となる遺伝子（多剤耐性遺伝子）を高発現し、抗癌剤に対して低い感受性を示すことを明らかにした。また、癌精巢抗原遺伝子は、癌幹細胞においてエピジェネティックな因子の制御を受けて高発現することを見出し、免疫療法の標的分子となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：癌、発現制御、遺伝学、発生・分化、免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、高い浸潤性、薬剤・放射線耐性、多様な組織像を示し、難治癌である原因となっている。がん精巢抗原遺伝子は、MHCクラスIにより腫瘍細胞表面に提示され、免疫機構によるがん細胞の排除に寄与することから、ペプチド療法などによる免疫療法の標的とされている。しかしながら、がん精巢抗原遺伝子は腫瘍組織内で不均一な発現を示すことが報告されたことにより、免疫機構による完全な腫瘍の排除は難しいことが示唆されている。一方、悪性グリオーマを含

む白血病、乳ガン等のがん細胞に幹細胞様細胞（がん幹細胞）が存在することが明らかとなり、腫瘍の再発、化学療法、放射線療法耐性の原因であると考えられている。このがん幹細胞の存在により、腫瘍組織が分化レベルの異なる細胞により構成されることで腫瘍は多様性を維持していることが考えられる。これらのことを踏まえ、難治癌である悪性グリオーマの新規治療法の開発のために、がん幹細胞の性状解析や治療標的となる分子及びこの腫瘍の多様性に関わる因子の同定が必要である。

## 2. 研究の目的

(1) 悪性脳腫瘍に由来するがん幹細胞株の分離

(2) がん幹細胞が高発現する多剤耐性遺伝子の同定

(3) がん幹細胞の抗癌剤感受性の検索

(4) がん幹細胞特異的抗原の同定

(5) 癌精巢抗原遺伝子の発現制御機構の解析

## 3. 研究の方法

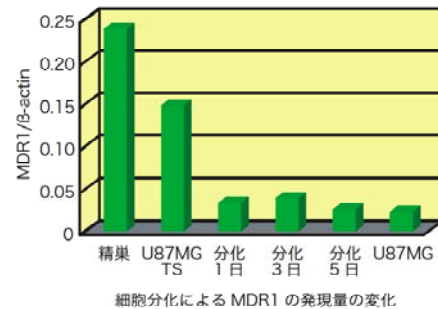
塩基性 FGF、EGF、LIF を含む神経幹細胞用培地 (DMEM/F12+N2) において悪性脳腫瘍細胞株及び組織から低密度の細胞濃度で長期培養後、形成されたスフェアは、低付着性培養皿で継代培養した。悪性脳腫瘍細胞株 (親株) の培養とがん幹細胞を含むスフェアから付着細胞への分化誘導には 10% の血清を含む DMEM 培地を用いた。それぞれの細胞から DNA、RNA、タンパクの精製を行った。幹細胞の同定には体性幹細胞マーカー CD133 の定量的 PCR や特異的抗体を用いた免疫組織 (細胞) 化学染色により行った。分離した幹細胞の造腫瘍性や形成された腫瘍組織の解析をするためにヌードマウス脳内へ  $1 \times 10^5$  細胞を定量的に移植した。癌精巢抗原遺伝子の発現制御機構の解析のために、抗アセチル化ヒストン H3 及び H4 を用いた CHIP アッセイによりプロモーター領域のクロマチン構造を検索した。同様にプロモーター領域の DNA メチル化状態を Bisulfite シークエンシング法で決定した。研究に用いられた臨床サンプルは、高知大学倫理委員会の承認とインフォームドコンセントの下、患者の許諾を得て使用した。

## 4. 研究成果

(1) 悪性グリオーマ細胞株 (U87MG、SNB19、T98G、ONS-23) や悪性グリオーマ患者組織を酵素処理により解離した細胞の神経幹細胞用の無血清培地を用いた培養により、約 2-3 週間後に数百以上の細胞からなる Tumor sphere の形成が観察された。得られた Tumor sphere の増殖には、神経幹細胞と同様に塩基性 FGF と EGF の要求性が高いことが MTT アッセイにより確認された。そして、CD133 の発現が免疫細胞染色により観察された。また、細胞株由来の Tumor sphere は血清を含む培地に戻すことで親株と同様の付着性の形態を示し、不死化細胞として増殖し続けた。2 例の患者組織由来の Tumor sphere のうち 1 つは、血清を含む培地で培養すると付着性の形態を示し、増殖を停止した。もう 1 例にお

いては、付着性を示さなかった。これらの親株、Tumor sphere、再び付着した細胞における CD133 の発現量を定量的 PCR により検索すると親株では、低発現で Tumor sphere で 2-16 倍上昇し、付着細胞では再び低発現に戻ることが観察された。また、細胞分化時に誘導される CDK インヒビターである p21 及び p27 の発現が親株と付着細胞で高く、Tumor sphere で低いことがウエスタンブロット法により確認されたことから、親株は、分化細胞を多く含み、分離した Tumor sphere は幹細胞が濃縮されており、再び血清を含む培地で分化誘導されることが考えられた。さらに、U87MG の Tumor sphere を免疫不全マウスに移植し、形成された腫瘍塊では、CD133 陽性の細胞はごく一部であったことから、腫瘍形成時には多くの細胞は分化誘導されたことが考えられた。また、p27 を発現している細胞と CD133 陽性細胞は一致しないことから形成された腫瘍塊では、分化した細胞と未分化な細胞が混在していることが示唆された。

(2) がん幹細胞が化学療法抵抗性に関与する可能性を検討するために、この脳腫瘍由来のがん幹細胞や分化した細胞を用いて多剤耐性遺伝子の発現を PCR 法で定量した。そのうち MDR1 (Multiple Drug Resistance 1) が U87MG の親株や再分化させた細胞と比較して Tumor sphere で高発現することが明らかとなった。また、免疫組織化学染色により悪性グリオーマの手術摘出組織において、CD133 陽性細胞が MDR1 を高発現することが観察された。



(3) がん幹細胞が多剤耐性遺伝子を高発現しているため、MTT アッセイにより細胞の生存率を計測し、実際に、抗癌剤に対して低感受性を示すかを検討した。Tumor sphere の抗癌剤への感受性が親株と比較して低いことが観察されたことで、MDR1 といった多剤耐性遺伝子の発現ががん幹細胞の治療抵抗性や腫瘍再発に関与する可能性が示唆された。MDR1 の発現頻度は腫瘍の悪性度と相関することが報告されていることから、腫瘍内におけるがん幹細胞の存在頻度も腫瘍の悪性度と相関していると考えられた。さらに、本課題では、組織アレイを用いた解析により

CD133 の発現頻度が Astrocytic tumor の悪性度と相関していることを見出している。

(4) エピジェネティックな因子による発現制御が報告されている MDR1 の発現に腫瘍組織内での細胞分化レベルが相関していることから、同様な制御を受けることが一部報告されている癌精巢抗原遺伝子の発現も変動することが考えられる。NCBI (National Center for Biotechnology Information) の発現データベース上の脳腫瘍で発現の高い 31 の癌精巢抗原遺伝子を選択し、4 細胞株の親株と Tumor sphere 間で半定量的 RT-PCR により比較検討した。親株と比較して、全てのケースのうち 36.3% で Tumor sphere において癌精巢抗原遺伝子が高発現していることが明らかとなった。また、癌精巢抗原遺伝子の一部では Tumor sphere でのみ発現が検出された遺伝子も存在し、がん幹細胞特異的抗原であると考えられた。一方、Tumor sphere で発現が低下していたケースは僅か 3.2 % であることから、がん幹細胞は癌精巢抗原遺伝子を高頻度に高発現している可能性が示唆された。

癌精巢抗原遺伝子の遺伝子産物は、細胞内のプロテアソーム経路により分解され、HLA クラス I により細胞表面に提示され、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の標的となることが知られている。悪性腫瘍は HLA 分子の発現低下により、免疫機構から逃れていることが報告されているので、がん幹細胞の免疫原性を検討するために、Tumor sphere の HLA 分子の発現を定量的 RT-PCR と免疫細胞化学染色で解析した。親株と Tumor sphere の HLA クラス I の発現量は、大きな差が無く、個々の細胞においてもほぼ均一な発現を示していることが確認された。このことから、がん幹細胞で高発現している癌精巢抗原遺伝子の遺伝子産物の一部が、細胞表面に提示され、ペプチドワクチンを用いた免疫療法の標的分子となる可能性が示唆された。さらに、この結果は、悪性グリオーマ組織を用いた免疫組織化学的解析によっても確認されている。

(5) 癌精巢抗原遺伝子の一部において、プロモーター領域の DNA メチル化やヒストンのアセチル化が、発現制御に関与していることが報告されている。癌精巢抗原遺伝子が高発現する機構におけるエピジェネティックな因子の寄与を検討するために、がん幹細胞で高発現を示した MAGEA3、NY-ESO-1、TRAG-3、LAGE-1 のプロモーター領域のヒストン H3 と H4 のアセチル化、DNA メチル化を検索した。U87MG と SNB19 の親株、Tumor sphere 及び再分化した細胞において、抗アセチル化ヒストン H3 と H4 抗体を用いた CHIP アッセイを行った結果、親株及び再分化した細胞では低ア

セチル化、Tumor sphere では高アセチル化状態であることが明らかとなった。次に、これらの細胞とヒト星状細胞、精巢における MAGEA3、NY-ESO-1、LAGE-1 のプロモーター領域のメチル化レベルを調べた。これらの遺伝子を発現する精巢と Tumor sphere では、プロモーター領域の DNA は、低メチル化状態で、発現しない又は発現が低いヒト星状細胞、親株では、高メチル化状態であった。再分化した細胞では中間のメチル化状態を示したことから分化誘導 5 日目では、分化に伴い再びメチル化されていくことが考えられた。つまり、がん幹細胞において癌精巢抗原遺伝子は、プロモーター領域のヒストン H3 と H4 の高アセチル化と DNA の低メチル化により発現し易い状態であり、分化した細胞では、それぞれ低アセチル化、高メチル化の状態が発現が抑制されていることが示唆された。さらに、がん幹細胞の再分化時に伴う癌精巢抗原遺伝子の発現低下は、DNA メチル化の阻害剤 5-aza-CdR (5-aza-2'-deoxycytidine) や HDAC (histone deacetylase) 阻害剤の VPA (Valproic acid) や臭化ナトリウムの添加により阻害されることから、ヒストン修飾や DNA メチル化といったエピジェネティックな因子が細胞分化レベルに相関した癌精巢抗原遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

これらの結果から、癌精巢抗原遺伝子は、個々の細胞の分化レベルに伴うエピジェネティックな因子の差異により発現制御されており、主にごん幹細胞の様な未分化な細胞が発現することで、腫瘍組織内における不均一な発現様式を示すことが示唆された。また、がん幹細胞が癌精巢抗原遺伝子を高頻度に発現することから、この細胞を標的とした免疫療法にとって、癌精巢抗原遺伝子が有用な分子であることが考えられた。今後は、多くの腫瘍組織を用いたがん幹細胞の癌精巢抗原遺伝子の種類や発現頻度を検索することで、より特異的にがん幹細胞を標的とするペプチドワクチン療法の開発に期待ができる。

## 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 1 件)

1. Nakai E, Park K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakabayashi H, Shimizu K: Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. Cancer Investigation, 印刷中, 査読有

[学会発表] (計24件)

1. 八幡俊男, 中居永一, 熊澤綾乃, 石田恵理, 田村雅一, 清水恵司: 脳腫瘍臨床組織に由来する癌幹細胞の樹立と性状の検討. 第8回日本再生医療学会総会, 2009/3/5-6, 東京
2. 清水恵司, 八幡俊男, 熊澤綾乃, 中居永一, 野中大伸, 田村雅一: ES細胞由来神経細胞移植によるパーキンソン病モデルの機能回復と脳内免疫応答の解析. 第8回日本再生医療学会総会, 2009/3/5-6, 東京
3. 清水恵司, 熊澤綾乃, 中居永一, 田村雅一, 八幡俊男: 同系および異系マウスパーキンソンモデルに移植したES細胞由来TH産生細胞のMHC抗原の表現性. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008/12/1-3, 京都
4. 川西 裕, 富永 明, 奥山洋美, 田口尚弘, 楠本 豊, 八幡俊男, 小野史郎, 清水恵司: Toll-like receptor 4を介したスピルリナ複合多糖体の抗腫瘍効果. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008/12/1-3, 京都
5. 八幡俊男, 熊澤綾乃, 川西 裕, 田村雅一, 清水恵司: 脳腫瘍組織における体性幹細胞マーカーCD133の発現頻度. 第26回日本脳腫瘍学会, 2008/11/30-12/2, 愛媛
6. 川西 裕, 富永 明, 奥山洋美, 田口尚弘, 楠本 豊, 八幡俊男, 小野史郎, 清水恵司: Spirulina 複合多糖体のTLR4 依存的抗腫瘍効果の検討. 第21回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2008/11/18-19, 東京
7. Shimizu K, Ikenaka K, Kawanishi Y, Tamura M, Yawata T: Killing activity of suicide gene therapy against cancer stem cells. 16th European Society of Gene & Cell Therapy Annual Congress, 2008/11/13-16, Brugge, Belgium
8. 中居永一, 中林博道, 小宮山雅樹, 政平訓貴, 川西 裕, 清水恵司: マウスグリオーマ幹細胞の浸潤能, および免疫組織学的解析. 社団法人日本脳神経外科学会第67回学術総会, 2008/10/1-3, 岩手
9. 川西 裕, 富永 明, 奥山洋美, 田口尚弘, 楠本 豊, 八幡俊男, 小野史郎, 清水恵司: グリオーマに対するSpirulina 複合多糖体の抗腫瘍効果. 社団法人日本脳神経外科学会第67回学術総会, 2008/10/1-3, 岩手
10. 中林博道, 八幡俊男, 田村雅一, 清水恵司: ヒト・グリオーマ細胞に対するparthenolideの抗腫瘍効果について. 社団法人日本脳神経外科学会第67回学術総会, 2008/10/1-3, 岩手
11. 清水恵司, 熊澤綾乃, 八幡俊男, 中居永一: 同系及び異系パーキンソン病モデルに対し, 免疫抑制剤非投与時におけるES細胞由来のTH細胞移植による機能回復の検討. 第31回日本神経科学大会, 2008/7/9-11, 東京
12. 熊澤綾乃, 八幡俊男, 梶 豪雄, 布施理子, 清水恵司: マウスES細胞由来ドーパミン産生神経の移植によるマウスパーキンソン病モデルの機能回復と脳内免疫応答の解析. 神経組織の成長・再生・移植研究会第23回学術集会, 2008/5/17, 千葉
13. Shimizu K, Kumazawa A, Toyonaga S, Masahira N, Nakabayashi H, Park K, Yawata T: Evaluation of CD133 expression in brain tumors using tissue array. AACR Annual Meeting 2008, 2008/4/12-16, San Diego, U.S.A.
14. 梶 豪雄, 中居永一, 土屋孝弘, 熊澤綾乃, 八幡俊男, 政平訓貴, 清水恵司: パーキンソン病モデルマウスに移植された異系ES細胞由来ドーパミン作動性神経細胞の長期生存. 第7回日本再生医療学会総会, 2008/3/13-14, 名古屋
15. Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakai E, Park K, Shimizu K: Enhanced expression of cancer testis antigen genes in cancer stem cells derived from glioma cell lines. An AACR Special Conference in Cancer Research; The Role of Cancer Stem Cells in the Initiation and Propagation of Tumorigenesis, 2008/2/12-15, Los Angeles, U.S.A.
16. 清水恵司, 八幡俊男, 中居永一, 熊澤綾乃, 千原隆弘, 政平訓貴, 朴 啓彰: 悪性グリオーマにおける癌精巢抗原遺伝子の発現と腫瘍細胞分化レベルの相関. 第25回日本脳腫瘍学会, 2007/12/9-11, 東京
17. 朴 啓彰, 八幡俊男, 中居永一, 熊澤綾乃, 千原隆弘, 中林博道, 清水恵司: グリオーマがん幹細胞におけるMDR1発現と薬剤耐性能. 第66回社団法人日本脳神経外科学会総会, 2007/10/3-5, 東京
18. 豊永晋一, 中居永一, 八幡俊男, 梶 豪雄, 川西 裕, 井川直樹, 政平訓貴, 中林博道, 朴 啓彰, 清水恵司: マウスグリオーマ腫瘍幹細胞: 神経幹細胞との比較. 第66回社団法人日本脳神経外科学会総会, 2007/10/3-5, 東京
19. 清水恵司, 八幡俊男, 中居永一, 千原隆弘, 熊澤綾乃, 朴啓彰: グリオーマ癌幹細胞における癌精巢抗原遺伝子の発現亢進. 第66回社団法人日本脳神経外科学会総会, 2007/10/3-5, 東京

20. Yawata T, Nakai E, Park KC, Shimizu K: Enhanced expression of cancer testis antigen genes in cancer stem cells derived from glioma cell lines. 第66回日本癌学会学術集会, 2007/10/3-5, 横浜
21. 八幡俊男, 中居永一, 千原隆弘, 熊澤綾乃, 豊永晋一, 朴 啓彰, 清水恵司: グリオーマ癌幹細胞における癌精巢抗原遺伝子の発現増強. 第8回日本分子脳神経外科学会, 2007/8/31-9/1, 兵庫
22. 中居永一, 八幡俊男, 豊永晋一, 梶 豪雄, 朴 啓彰, 清水恵司: マウスグリオーマ腫瘍幹細胞の遺伝子発現、および免疫組織学的解析. 第25回日本脳腫瘍病理学会, 2007/4/19-20, 熊本
23. 豊永晋一, 中居永一, 八幡俊男, 梶 豪雄, 政平訓貴, 井川直樹, 中林博道, 山田昌興, 朴 啓彰, 清水恵司: マウスグリオーマ腫瘍幹細胞の形態学的特徴: 神経幹細胞との比較. 第25回日本脳腫瘍病理学会, 2007/4/19-20, 熊本
24. Shimizu K, Yawata T, Nakai E, Toyonaga S, Chihara T, Maeda Y, Okiku M, Masahira N, Ikenaka K: Killing activity of HSV-TK/GCV suicide gene therapy for cancer stem cells derived from malignant glioma. 5th Australasian Gene Therapy Society Meeting, 2007/4/18-20, Canberra, Australia

[図書] (計 2 件)

- ① 八幡 俊男, 清水 恵司: 腫瘍内在幹細胞. 寺本 明 (編) NS NOW No.5 グリオーマ - その最新知見, メジカルビュー社, pp40-45, 2009. 2
- ② Kaji T, Tsuchiya T, Yawata T, Nakabayashi H, Yamada SM, Park KC, Shimizu K: PU.1 is required for the activation of mouse embryonic stem cell-derived microglia. Broglio PV (ed): Neuroimmunology Research Focus, Nova Science Publishers, Inc., pp159-173, 2007

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「腫瘍特異的プロモーターおよびその用途」

発明者: 清水 恵司, 八幡 俊男

権利者: 国立大学高知大学

種類: 特許権

番号: 特願 2009-95888

出願年月日: 平成 21 年 4 月 10 日

国内外の別: 国際特許

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

中林 博道 (NAKABAYASHI HIROMICHI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号: 70346716

梶 豪雄 (KAJI TAKAO)

東北大学・未来医工学治療開発センター・助教

研究者番号: 70343366

政平 訓貴 (MASAHIRA NORITAKA) ※2007

高知大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80444769