

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791377

研究課題名(和文)

新規グリオーマ幹細胞増殖因子の同定

研究課題名(英文)

Identification of novel growth factor for Glioma cancer stem cells

研究代表者

高橋 里史 (TAKAHASHI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20383870

研究成果の概要(和文)：

新規グリオーマ幹細胞増殖因子の同定を目的として研究を行い、KIF23 と uPARAP を同定した。KIF23 knock down により、グリオーマ細胞の増殖能は著明に抑制された。uPARAP knock down によりグリオーマ細胞のアクチン細胞骨格は変化し、結果としてその移動能及び浸潤能が著明に抑制された。また KIF23 及び uPARAP はグリオーマ幹細胞においてもタンパク質レベルにおいて発現している事が確認された。

研究成果の概要(英文)：

We have conducted our research for the purpose of identifying novel growth factors for glioma cancer stem cells, and identified KIF23 and uPARAP. Downregulation of KIF23 in glioma cells suppressed their proliferation. Downregulation of uPARAP in glioma cells suppressed migration and invasion properties of glioma cells through changes in actin cytoskeleton. We have also confirmed the expressions of the both molecules in glioma cancer stem cells at protein level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：脳腫瘍学, 腫瘍幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Glioma は現在の手術、放射線、そして化学療法といった集学的治療をもってなお根治困難な悪性脳腫瘍である。特に Grade IV である Glioblastoma の平均余命は 12 ヶ月と報告されており、その不良な予後を端的に表している。

一般的に癌は治療から逃れ、そして再発するという事に関し優れた能力を有しており、Glioma が治療困難である所以もここにある。その能力の解明に関し、近年、self renewal, multipotency, tumor-initiating といった特徴を持つ癌幹細胞の同定とその理解が重要視されている。

Glioma においても Glioma 幹細胞が同定され、当初 CD133 がその表面抗原として提唱された。Glioma can 幹細胞の特性を持つと考えられるこの CD133 陽性の細胞集団の特徴として、Bao らは 2006 年に CD133 陽性の細胞集団が効率的な DNA 修復能力を持ち、放射線治療に抵抗性を示すことを報告し、また Piccirillo らは同年神経前駆細胞から成熟 astrocyte への分化を誘導する液性因子である BMPs が CD133 陽性の Glioma 細胞の分化を誘導し、腫瘍形成能を下げる事を報告した。いずれの報告も腫瘍全体を標的とするよりも、Glioma 幹細胞を治療対象とする事の妥当性を示唆しており、これらの知見から Glioma の幹細胞を標的とした新規 Glioma 分子標的療法を考えるに至った。

## 2. 研究の目的

Glioma という全身の癌を見渡してもなお非常に治療困難で予後が悪い疾患の予後改善、更には治癒に寄与し得る新規分子標的療法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1)以下に述べる数種類のクローニング法を用いて Glioma 幹細胞に対する分子標的療法の標的として使用し得る遺伝子を選別した。

①レトロウイルスを用いた発現クローニング法。

②免疫学的手法である SEREX 法を用いた遺伝子クローニング法。

③発現解析のための cDNA マイクロアレイを用いた手法。

(2)上記それぞれのクローニング法を用いて同定された遺伝子に関して、glioma 幹細胞、glioma 細胞、glioma 患者検体、正常組織における発現を検討した。

(3)それぞれの遺伝子の glioma 細胞における機能解析を行う事を目的に siRNA の手法を用いた遺伝子の発現抑制を用いた機能実験を行い、同定した遺伝子の機能を明らかにした。

## 4. 研究成果

(1)遺伝子の同定(一部先行研究の成果も含む)

前述の①～③のクローニング法を用いて遺伝子のクローニングを施行、①の方法は遺伝子のクローニングに至らなかった。②の方法からは KIF23 と SMC4 を、③の方法からは uPARAP, LPAR2, GM2A, CDKN1 を同定した。それぞれの遺伝子の発現を NCBI が公開するデータベースで正常脳に対して Glioma で高発現をしている事を条件として検索、②のクローニング法を用いて同定した遺伝子の中からは KIF23 に関して、③のクローニング法を用いて同定した遺伝子の中からは uPARAP に

関して、研究を進める事とした。

(2)KIF23

①発現解析

KIF23 は定量 PCR の結果、正常組織の中では胃と精巣に比較的高発現していた。ウエスタンブロットを行うと正常脳に比較して Glioma 組織で高発現している事が明らかになったが Glioma の悪性度グレードと KIF23 の発現の間に明らかな相関関係は認められなかった。検討した Glioma cell line 細胞 5 種類全て (SF126, KNS81, T98G, KNS42, U87MG) において KIF23 のタンパク質レベルでの発現が確認された。

②Glioma 細胞における KIF23 の knock down U87MG と SF126 の 2 種類の Glioma 細胞において独立した 2 種類の sequence の siRNA を作用させたところ、transfection から 72 時間後にタンパク質レベルで有意に KIF23 の発現を抑制し得る事が明らかになった(図 1)。

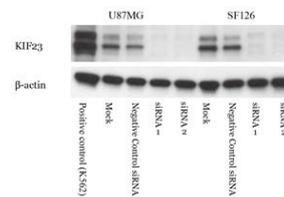


図 1

③KIF23 knock down による Glioma 細胞の増殖抑制

U87MG と SF126 において KIF23 を knock down すると細胞の増殖が抑制される事が示された(図 2)。

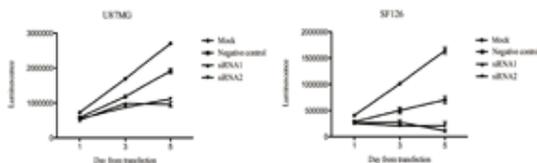


図 2

④KIF23 knock down による Glioma 細胞形態の変化

SF126 において KIF23 の knock down が Glioma 形態に及ぼす影響を評価したところ細胞の多角化と膨化が認められた。FACS による解析結果と合わせると G2 arrest が起こっている事が伺われた(図 3)。

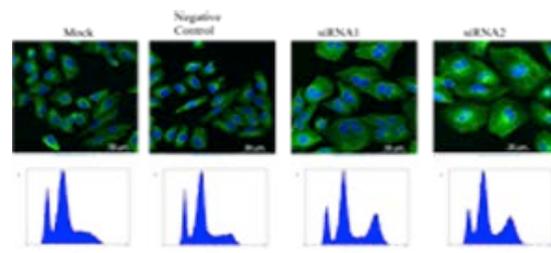


図 3

⑤ *in vivo*における KIF23 knock down 効果の評価

*in vivo*においてマウス Glioma モデルの RNAi による治療実験を行った所治療群における腫瘍体積はコントロール群と比較して小さい事が示された。

(3) uPARAP

① 発現解析

uPARAP は定量 PCR の結果、正常組織の中では心臓と胃と精巣に比較的高発現していた。ウェスタンブロットを行うと正常脳に比較して Glioma 組織で高発現している事が明らかになったが Glioma の悪性度グレードと uPARAP の発現の間に明らかな相関関係は認められなかった。検討した Glioma cell line 細胞の中で KNS42 と KNS81 において uPARAP のタンパク質レベルでの発現が確認された。

② Glioma 細胞における uPARAP の knock down  
KNS42 と KNS81 の 2 種類の Glioma 細胞において独立した 2 種類の sequence の siRNA を作用させたところ、transfection から 48 時間後から 72 時間後までの間持続してタンパク質レベルで有意に uPARAP の発現を抑制し得る事が明らかになった(図 4)。

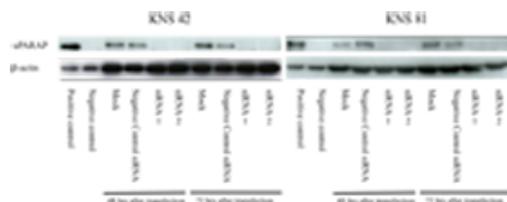


図 4

③ uPARAP knock down により Glioma 細胞の移動及び浸潤能の抑制

KNS42 と KNS81 において uPARAP を knock down すると細胞の移動及び浸潤能(図 5)が抑制される事が示された。

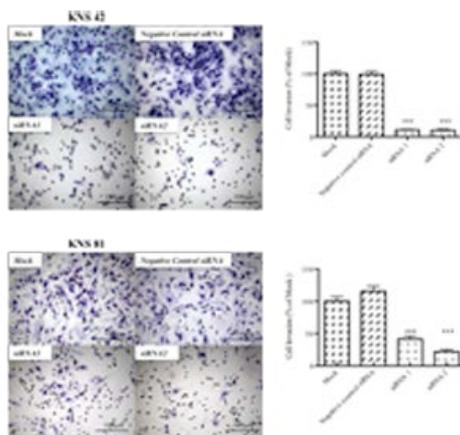


図 5

④ uPARAP knock down による Glioma 細胞形態の変化

uPARAP knock down により KNS42 細胞におけるアクチンは lamellipodia が消失し stress fiber が目立つようになった。また細胞は小型から大型に変化し、これらの phenotype は uPARAP knock down によって Gliomas 細胞が“動かない”細胞の特性を備えるようになった事を示していた。

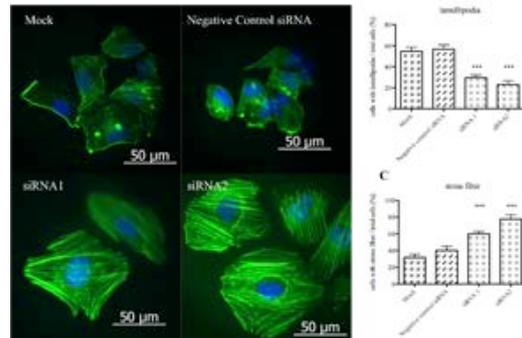


図 6

(4) Glioma 幹細胞における KIF23 と uPARAP の発現

我々の研究室で深谷らが独自に継代培養に成功した Glioma 幹細胞株数種において(未発表; personal corresponding) KIF23 及び uPARAP の発現をタンパク質レベルで確認した。

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. Takahashi S, Yamada-Okabe H, Hamada K, et al. Downregulation of uPARAP mediates cytoskeletal rearrangements and decreases invasion and migration properties in glioma cells. *J Neurooncol.* 2011 Jun;103(2):267-76. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会; 2010/11/29; 軽井沢  
脳腫瘍幹細胞・グリオーマ共通抗原の発現および機能解析 戸田正博、田伏将尚、大多茂樹、深谷雷太、高橋里史、吉田一成

2. 第 69 回社団法人日本脳神経外科学会総会; 2010/10/28; 福岡  
Glioma における KIF23 発現の検討と機能解析 高橋里史、戸田正博、吉田一成

3. 9<sup>th</sup> congress of the European association of neurooncology; September 16-19 2010

Maastricht, Netherland  
P.002 Down-regulation of membrane protein uPARAP makes glioma cells immobile and can be a target for novel glioma therapy S. Takahashi, T. Kawase, M. Toda

4. 慶應ニューロサイエンス研究会；  
2010/5/29；東京

RNA interference-mediated down-regulation of uPARAP decreases invasion and migration property in glioma cells through reorganization of the actin cytoskeleton. Takahashi S, Toda M, Yamada-Okabe H, Hamada K, Kawase T, Yoshida K

5. AACR 101<sup>st</sup> annual meeting  
2010: 18 April 2010; Washington, D.C.  
RNA interference-mediated downregulation of uPARAP decreases invasion and migration property in glioma cells through reorganization of the actin cytoskeleton Satoshi Takahashi, Masahiro Toda, Hikaru Sasaki, Takeshi Kawase.

6. 第5回「脳腫瘍の基礎シンポジウム」30  
January, 2010; 東京  
siRNAを用いたuPARAP knock downはGlioma  
培養細胞の移動・浸潤能を抑制する  
高橋里史, 河瀬斌, 戸田正博

7. 第68回社団法人日本脳神経外科学会総  
会；2009/10/16；東京  
GliomaにおけるuPARAP発現の検討と機能解  
析 高橋里史, 戸田正博, 河瀬斌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 里史 (TAKAHASHI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20383870

##### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし