

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84414

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592181

研究課題名(和文) ヒトグリオーマ幹細胞の生存・増殖・未分化性維持に関わるニッチの解明

研究課題名(英文) Analysis of niche involved with survival, proliferation, and maintenance of undifferentiated state of glioma stem cell

研究代表者

金村 米博 (KANEMURA, Yonehiro)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・先進医療研究開発部 再生医療研究室・室長

研究者番号：80344175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトグリオーマ幹細胞(GSC)の生存・増殖・未分化性維持に関わるニッチ解明を目指し、GSC樹立、細胞特性および分子遺伝学的特性解析を実施した。56検体の腫瘍組織から長期培養可能腫瘍細胞凝集塊(LC-TS)を11株樹立成功した。腫瘍組織型(grade4、再発・2次性腫瘍)、遺伝学的特性(野生型IDH1/2、TP53、TERTプロモーター変異、MGMTプロモーター低メチル化、抗原X陽性)とLC-TS樹立効率との関連性を明らかにし、*in vivo*腫瘍形成能が異なるLC-TSが存在し、複数の遺伝子発現差異が関与することを明らかにした。これらはGSCの特性解明に通じる成果であると結論づけられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we isolated 11 long culture-tumorspheres (LC-TS) from 56 glioma tissues and examined their cellular and genetic properties to examine niche involved with survival, proliferation, and maintenance of undifferentiated state of glioma stem cells (GSC). It was shown that histological (WHO grade4, recurrent, and secondary tumors), and genetic (wild IDH1/2 and TP53, telomerase reverse transcriptase promoter mutation, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter hypermethylation, and antigen X-positive) features of tumors were concerned with efficiency of LC-TS establishment. It was also revealed that each LC-TS had different *in vivo* tumorigenicity, and suggested that it might be caused by difference of some gene expression. It is concluded that these findings will contribute to well understanding of GSC biology.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：glioma stem cell survival proliferation undifferentiated state niche

1. 研究開始当初の背景

グリオーマ幹細胞 (GSC) は、神経幹細胞 (NSC) と類似の特性を有する細胞と考えられ、今後の悪性グリオーマ治療戦略開発の新しい標的細胞であり、GSC の生存・増殖・未分化能維持に関わる分子メカニズムおよび微小環境 (ニッチ) 解明の重要性が叫ばれていた。応募者はこれまでの研究から、NSC と種々の前駆細胞・分化細胞が混在するヘテロな細胞集団から形成されるヒト neurosphere 構造は、ヒト NSC の *in vitro* における生存・増殖・未分化能維持に好都合なニッチを提供する3次元構造体であることを見出している。一方、グリオーマ細胞の tumorsphere 作製効率は明らかに低く、GSC の生存・増殖・未分化能維持に対する tumorsphere 構造の生物学的意義は不明であり、これら従来の研究成果を更に発展させて、本研究計画を計画した。

2. 研究の目的

(1) 悪性グリオーマ細胞が *in vitro* で形成する tumorsphere の特性解析

Neurosphere 法を用いて悪性グリオーマ組織から樹立した tumorsphere の構造および tumorsphere を構成する細胞集団の特徴を、ヒト neurosphere と比較しながら詳細に解析し、その特徴を明らかにする。

(2) tumorsphere 構造の生物学的意義の検討と *in vitro* における GSC の生存・増殖・未分化能維持に関わるニッチの解明

Tumorsphere の大きさ・内部環境と GSC の生存・増殖・未分化能維持との関連性を検討し、tumorsphere 構造の生物学的意義と *in vitro* における GSC の生存・増殖・未分化能維持に関わるニッチを考察し、さらに GSC の新規マーカーの探索を行う。

(3) 悪性グリオーマ組織における GSC の生存・増殖・未分化能維持に関わるニッチの探索

GSC の生存・増殖・未分化能維持との関連性が示唆された *in vitro* における GSC のニッチがグリオーマ臨床組織標本中に存在するかを検討し、*in vivo* における GSC のニッチの解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) GSC の樹立

各種グリオーマ患者由来腫瘍組織から、増殖因子 (EGF, FGF2, LIF) を含む無血清培地を使用した neurosphere 法を用いて GSC の樹立を実施した。

(2) GSC の細胞特性解析

初代 tumorsphere と長期継代後 tumorsphere のそれぞれから RNA を作成し、マイクロアレイ (Affymetrix 社製 Genechip) を用いた網羅的解析を実施し、標的遺伝子に関しては定量的 RT-PCR 解析を用いて検証を

行った。1%FBS を用いた分化誘導アッセイを行い、各 tumorsphere の細胞分化能の評価を実施した。樹立細胞の *in vitro* 細胞特性解析として、tumorsphere と正常神経前駆細胞 (iPS 細胞由来) との共培養を行い、正常神経系細胞に及ぼす影響を検証した。腫瘍形成能評価として、免疫不全マウス (NOG マウス) の脳内に定位的に移植を行い、形成腫瘍の組織学的特性を解析した。

(3) GSC の分子遺伝学的特性解析

分子遺伝学的特性解析として、遺伝子変異 (IDH1/2, TP53, TERT プロモーター、ヒストン H3 バリエーション) MGMT 遺伝子プロモーターメチル化率、および抗原 X 陽性率の評価を実施した。

4. 研究成果

1. 長期培養可能な腫瘍細胞凝集塊 (LC-TS) の樹立効率

合計 56 検体のグリオーマ腫瘍組織 (WHO grade 4: 48 例、grade 3: 4 例、grade 2: 4 例) から tumorsphere 樹立を実施した結果、初代 tumorsphere 形成数は 41 検体から作成可能であった (樹立成功率: 73.2%)。41 株中、30 株は数継代以内に維持培養が困難となった腫瘍細胞凝集塊 (short culture-tumorsphere: SC-TS) であり、長期培養可能な腫瘍細胞凝集塊 (long culture-tumorsphere: LC-TS) は 11 株樹立された (樹立成功率: 19.6%)。腫瘍組織型と SC-TS および LC-TS 樹立との関連性の検討では、SC-TS および LC-TS の樹立成功率はそれぞれ、WHO grade 4 腫瘍 (75%、22.9%)、grade 3 腫瘍 (100%、0%)、grade 2 腫瘍 (25%、0%) であり、SC-TS は grade 4 および 3 の腫瘍からは高率に樹立可能であるが、LC-TS は全例 grade 4 腫瘍からの樹立に限定され、grade 4 腫瘍でも初発例より再発腫瘍および 2 次性腫瘍でより樹立成功率が高い傾向が明らかにされた。これら成果から、LC-TS 樹立と腫瘍組織型との関連性が示唆された。

2. LC-TS における遺伝子発現特性と *in vivo* 腫瘍形成能との関連性

LC-TS の 2 株 (GDC40 および GDC90) に関して、その詳細な特性解析を実施した。遺伝子発現解析の結果では、GDC40 細胞と比較して、GDC90 細胞では神経幹細胞で高発現する NESTIN、PAX6 に加え、放射状グリア細胞で発現が見られる GFAP および BLBP が高発現することが明らかに成った。iPS 細胞由来神経前駆細胞との *in vitro* 共培養系を用いた解析では、GDC90 細胞は神経前駆細胞の神経分化を強力に支援する特性を有し、逆に GDC40 細胞にはそのような特性は見られないことが明らかに成った。一方、NOG マウスの脳内移植実験では、GDC40 細胞は浸潤性の著明な大きな腫瘍塊を形成する特性を有したが、GDC90 細胞からは大きな腫瘍塊形成は見られ

ず、in vivo での腫瘍塊形成能力が非常に小さいことが明らかに成った。以上の成果から、同様の手法を用いて樹立した2株のLC-TSにおいて、in vivo での腫瘍形成能が大きく異なる細胞が存在することが明らかになり、その特性差に幾つかの遺伝子発現の差異が関与すること可能性が示され、これら分子がLC-TSのin vivo 腫瘍形成能に関与する可能性が示唆された。

3. LC-TC 樹立成功率と分子遺伝学的特性との関連性

LC-TC 樹立成功率と分子遺伝学的特性との関連性の検討では、野生型 IDH1/2、野生型 TP53、TERT プロモーター変異、MGMT 遺伝子プロモーター低メチル化状態、の特性を有する腫瘍からLC-TCが樹立される割合が高い傾向が明らかになった。また、抗原X陽性腫瘍からはLC-TCが樹立される割合が高い傾向が明らかにされた。以上の結果から、これら同定された分子遺伝学的特性がLC-TS樹立に関与する分子マーカーになり得る可能性が示唆され、グリオーマ幹細胞の生存・増殖・未分化性維持に関わる in vitro ニッチの解明につながる分子であると結論づけられた。

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6件)

Okita Y, Nonaka M, Shofuda T, Kanematsu D, Yoshioka E, Kodama Y, Mano M, Nakajima S, Kanemura Y: (11)C-methionine uptake correlates with MGMT promoter methylation in nonenhancing gliomas. Clin Neurol Neurosurg 125:212-216, 2014 査読有
DOI:10.1016/j.clineuro.2014.08.004

Bamba Y, Shofuda T, Kanematsu D, Nonaka M, Yamasaki M, Okano H, Kanemura Y: Differentiation, polarization, and migration of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells co-cultured with a human glial cell line with radial glial-like characteristics. Biochem Biophys Res Commun 447:683-688, 2014 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.04.070

金村米博: 悪性グリオーマ治療における免疫療法の進歩. 医学のあゆみ 249:267-269, 2014 査読無

金村米博, 正礼智子, 市村幸一, 西川 亮, 山崎麻美, 渋井壮一郎, 新井 一: 小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築: 髄芽腫, 上衣腫. 小児の脳神経 38:333-339, 2014 査読有

佐々木貴浩, 藤田浩二, 深井順也, 大林慎始, 神波信次, 金村米博, 上松右二, 中尾直之: 神経性抗原発現を示した大脳半球神経膠芽腫の小児例. Neuro-Oncology の進歩 21:27-30, 2014 査読有
DOI: 10.11452/neurooncology.21.2_27

Ohta S, Misawa A, Fukaya R, Inoue S, Kanemura Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival and proliferation of neural stem/progenitor cells. J Cell Sci 125:3210-3220, 2012 査読有
DOI: 10.1242/jcs.102210

[学会発表](計25件)

福岡講平, 福島慎太郎, 山下 聡, 正礼智子, 中村大志, 山崎夏維, 高見浩数, 松下裕子, 牛島俊和, 成田善孝, 金村米博, 山崎麻美, 渋井壮一郎, 新井 一, 西川 亮, 市村幸一: 上衣腫のメチル化解析による分子遺伝学的分類. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会, 2014年12月1日; 浦安市

金村米博, 市村幸一, 正礼智子, 西川 亮, 山崎麻美, 新井 一, 渋井壮一郎: 日本小児分子脳腫瘍グループ: 全国レベルでの小児頭蓋内悪性腫瘍の分子診断体制の構築. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会, 2014年12月1日; 浦安市

沖田典子, 桒中正博, 正礼智子, 兼松大介, 吉岡絵麻, 児玉良典, 眞野正幸, 中島 伸, 金村米博: 非造影神経膠腫における¹¹C-methionine PETでのMGMTプロモーターメチル化率の予測. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会, 2014年12月1日; 浦安市

深井順也, 上松右二, 金村米博, 正礼智子, 吉岡絵麻, 藤田浩二, 中尾直之: ラブドイド・グリオプラストーマの臨床・病理学的検討: 自験例報告と文献的考察. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会, 2014年11月30日; 浦安市

Kanemura Y, Ichimura K, Shofuda T, Nishikawa R, Yamasaki M, Taylor MD, Arai H, Shibui S: Japanese Pediatric Molecular Neuro-oncology Group (JPMNG): establishment of a nationwide molecular diagnostic network for pediatric malignant brain tumors in Japan. 19th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, 2014年11月14日; Miami, FL, USA

金村米博: 日本小児分子脳腫瘍グループ: 全国レベルでの小児頭蓋内悪性腫瘍の遺

伝子診断体制の構築．一般社団法人日本脳神経外科学会第73回学術総会，2014年10月10日；東京都港区

Kanemura Y, Ichimura K, Shofuda T, Nishikawa R, Yamasaki M, Shibui S, Arai H: Establishment of a nationwide molecular diagnostic network for pediatric malignant brain tumors in Japan. 16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, 2014年6月30日-7月1日；Singapore

金村米博，市村幸一，正札智子，西川 亮，山崎麻美，新井 一，渋井壮一郎：日本小児分子脳腫瘍グループ：小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築．1. 髄芽腫、上衣腫．第32回日本脳腫瘍病理学会，2014年5月24日；徳島市

金村米博：髄芽腫分子遺伝学的診断．第34回日本脳神経外科コンgres総会，2014年5月18日；大阪市北区

Kanemura Y, Sumida M, Yoshioka E, Yamamoto A, Kanematsu D, Takada A, Nonaka M, Nakajima S, Goto S, Kamigaki T, Takahara M, Maekawa R, Shofuda T, Moriuchi S, Yamasaki M: Vaccination of dendritic cells loaded by electroporation with autologous tumor lysate for patients with recurrent malignant glioma: evaluation of safety and immune response. 2013 SNO 18th Annual Scientific Meeting, 2013年11月23日；San Francisco, USA

Sumida M, Yoshioka E, Yamamoto A, Kanematsu D, Furuya Y, Fukusumi H, Takada A, Nonaka M, Nakajima S, Mori K, Goto S, Kamigaki T, Maekawa R, Shofuda T, Moriuchi S, Yamasaki M, Kanemura Y: Clinical usefulness of adoptive immunotherapy using autologous lymphokine-activated killer cells for temozolomide-induced lymphopenia of glioblastoma patients. 19th ISCT Annual Meeting, 2013年4月22日-25日；Auckland, New Zealand

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金村 米博 (KANEMURA, Yonehiro)
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・先進医療研究開発部 再生医療研究室・室長
研究者番号：80344175

(2) 研究分担者

正札 智子 (SHOFUDA, Tomoko)
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・先進医療研究開発部 幹細胞医療研究室・室長
研究者番号：40450895

(3) 連携研究者

岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60160694

岡田 洋平 (OKADA, Yohei)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30383714

角田 達彦 (TSUNODA, Tatsuhiko)
独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター
研究者番号：10273468

宮 冬樹 (MIYA, Fuyuki)
独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員
研究者番号：50415311

末水 洋志 (SUEMIZU, Hiroshi)
公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・部長
研究者番号：40332209

中村 雅登 (NAKAMURA, Masato)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：00164335