

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460049

研究課題名(和文) グリオーマ癌幹細胞選択的遺伝子発現システムの構築による新規脳腫瘍治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for glioma by construction of glioma stem cell specific gene expression system.

研究代表者

丸山 正人 (MARUYAMA, Masato)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00399445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマは、脳腫瘍の中で最も多くみられる悪性腫瘍であり、治療後の再発率が高く、予後が悪い。近年、腫瘍治療後の転移・再発の原因として、癌幹細胞が注目されている。これまでに実施されたグリオーマに対する様々な臨床試験は、腫瘍全体を標的としており、治療抵抗性を有する癌幹細胞には有効でなかったため、治療効果が得られなかったと考えられている。そこで本研究では、ヒトグリオーマの癌幹細胞株を樹立し、グリオーマ癌幹細胞株に特異的に発現する遺伝子を同定したことで、グリオーマ癌幹細胞選択的に治療用遺伝子を発現させるための分子基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：Gliomas are most common type of brain tumor and malignant gliomas have high recurrence rates and poor prognosis. In recent years, cancer stem cells are considered to be a cause of metastasis and recurrence after treatment. Since past therapeutic strategy against glioma targets whole tumor cells, these strategy are not effective for cancer stem cells which shows resistant to therapy. Here, we established human glioma stem cell lines and constructed molecular basis to specifically express therapeutic genes in glioma stem cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：癌幹細胞 グリオーマ 遺伝子発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

グリオーマは、治療後の再発率がきわめて高く、平均生存期間は約1年程度である。近年、腫瘍治療後の転移・再発の原因として、癌幹細胞の存在が注目されている。癌幹細胞は、腫瘍組織内にごく少数存在する治療抵抗性を有した腫瘍形成細胞であるため、腫瘍摘出後に少量でも残存していると、再発の要因になると考えられている。これまでに、グリオーマの根治を目指した様々な臨床試験が国内外で実施されてきたが、有効な治療法は見出されなかった。その一因として、これまでの方法が、腫瘍全体をターゲットとしていたため、治療抵抗性を有する癌幹細胞に対して有効でなかったことが挙げられている。そのため、最近では、癌幹細胞をターゲットとした治療法が有効であると考えられるようになってきた。しかしながら、癌幹細胞の存在自体は強く示唆されているものの、癌幹細胞の由来、特異性の高いバイオマーカー、腫瘍形成メカニズムなど、癌幹細胞の分子基盤となる情報が不足しており、未だに仮説の域を出ないため、効率的な治療法の開発には至っていない。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究経緯から、Nestin 陽性細胞選択的に、Nestin エンハンサー領域が、高い遺伝子発現を誘導することを明らかにしている。グリオーマ癌幹細胞では、神経幹細胞マーカーとして知られている CD133 や Nestin がマーカー分子になると考えられており、これらの分子が高発現しているほどグリオーマの悪性度が高く、生存率が低くなることも知られている。そこで、Nestin エンハンサーを利用して癌幹細胞選択的に治療用遺伝子を高発現させるシステムを構築できれば、癌幹細胞選択的に治療用遺伝子を発現させる手段として利用できると考えられる。そこで、まず、種々のグリオーマ細胞株を用いて、Nestin エンハンサーによる癌幹細胞選択的遺伝子発現について検討する。

その一方で、癌幹細胞と正常組織幹細胞は

似通った特徴を有しており、これまでに、グリオーマ癌幹細胞のマーカーとして考えられている Nestin や CD133 は、元来、脳に内在性に存在する神経幹細胞のマーカーであることが知られている。そこで、グリオーマ癌幹細胞特異的に発現する真のバイオマーカーを新たに同定し、癌幹細胞に対するデリバリーシステムの構築や新たな治療標的分子の同定など、新規創薬・治療法の開発に繋がる分子基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) ルシフェラーゼアッセイ

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む各種プラスミド DNA とウミシイタケルシフェラーゼとを、lipofectamine2000 との複合体として、ラット C6 グリオーマ細胞に遺伝子導入した。24 時間後のホタルルシフェラーゼの遺伝子発現量を、ウミシイタケルシフェラーゼで補正し、pGL3-Hsv 由来の遺伝子発現量を1として算出した。

### (2)培養条件

接着培養において、ヒトグリオーマ由来 U87MG 細胞は、血清培地(MEM, 2mM L-グルタミン酸、10%ウシ胎児血清、非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン-ストレプトマイシン)で培養し、C6 細胞は、血清培地(Ham's F12, 2mM L-グルタミン酸、10%ウシ胎児血清、ペニシリン-ストレプトマイシン)で培養した。

スフェロイド培養では、いずれの細胞も無血清培地 (DMEM/F12, N2, B27 supplement, 20ng/ul bFGF, 20ng/ul EGF, 0.6%メチルセルロース)で培養した。

### (3) SP 画分の単離

接着培養した細胞及び 14 日間スフェロイド培養した U87MG 細胞を Accutase により解離させ、bFGF,EGF 含有 DMEM/F12 培地中で  $1 \times 10^6$  cells/ml に調製した。37°Cで 10 分間培養後、Hoechst33342を再終濃度 2.5  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加し、37°Cで 90 分間培養した。排出ポンプ阻害実験は、Hoechst33342 と同時に verapamil を

最終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$  になるように同時に添加した。90 分間培養後、細胞を 2%FBS-PBS で洗浄し、セルストレーナーを通して、再終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  になるように propidium iodide を加えた。Propidium iodide で染まらなかった生細胞フローサイトメーターで解析した。

#### (4)細胞周期解析

U87MG 細胞を 14 日間スフェロイド培養後、(3)と同じ方法で、2%FBS 含有 MEM 培地で細胞を調製した。Hoechst33342 を再終濃度 2.5  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加して、45 分後 Pyronin Y を 0.5  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加した。さらに 45 分後、細胞を洗浄し、セルストレーナーを通した後、死細胞判定のために 7AAD を加え、フローサイトメーターで解析した。

#### (5)RT-PCR 法

細胞から RNA を抽出後、逆転写反応を行い、cDNA を調製した。cDNA を鋳型として、PCR を行い、各遺伝子の発現をアガロースゲル電気泳動して確認した。

### 4. 研究成果

初めに、Nestin エンハンサーが、ラット C6 グリオーマ細胞において、外来遺伝子を高発現させるかどうかについて検討するため、ラット由来 Nestin エンハンサーの下流でルシフェラーゼを発現するベクターを用いて、レポーターアッセイを行った(図 1)。ラット C6 グリオーマ細胞において、内因性の Nestin が発現していることを、免疫染色法により確認し、Nestin エンハンサーのコア領域を含む pN257HL や pN257x2HL を遺伝子導入したところ、pGL3-Hsv を遺伝子導入した時に比べて、約3倍高い遺伝子発現が見られた。しかし、Nestin エンハンサーの全領域を含むプラスミド(pNHL)を遺伝子発現させても、ルシフェラーゼの発現は確認できなかった。癌幹細胞の population は非常に低いので、エンハンサーの効果が隠れてしまっている可能性が考えられた。そこで、癌幹細胞と非癌幹細胞を分けて解析を行うため、癌幹細胞を単離する方法を検討した。

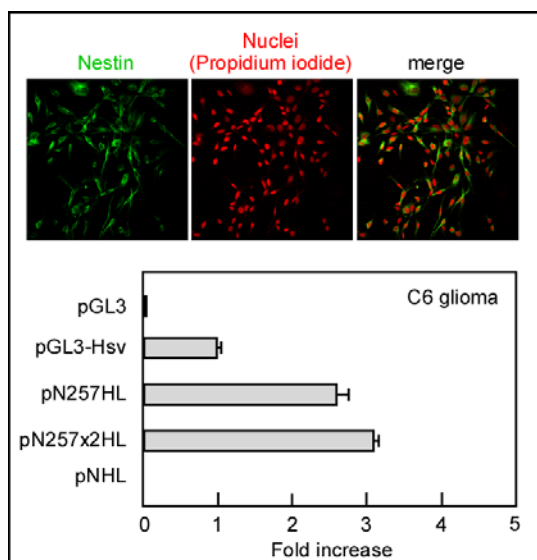


図 1 C6 グリオーマ細胞における Nestin エンハンサーの機能解析

これまでの報告から、癌幹細胞は、DNA 結合色素 (Hoechst33342) に対して高い排出能を有する細胞集団(Side Population 画分, SP 細胞)として、フローサイトメリーにより分取されることが知られており、SP 画分は、verapamil の添加による SP 画分の消失を指標に、同定することができると考えられている。また、血清不含培地中 (20ng/ml bFGF, EGF 存在下)で癌細胞を浮遊培養すると、癌幹細胞が凝集塊 (スフェロイド)を形成して増殖することが知られている。そこで、スフェロイド培養で増殖させた細胞から、SP 画分(癌幹細胞)を単離することを試みた。

しかしながら、ヒトグリオーマ由来細胞株 U87MG 細胞株と C6 グリオーマ細胞を用いて検討した結果、いずれの細胞でも、verapamil を用いることで SP 画分の消失が見られなかったことから、これらの細胞において、SP 画分は存在しないと結論づけた(図2)。

そこで、癌幹細胞を単離する別の方法として、FACS により single cell sorting を行い、Single cell-derived sphere(単一細胞由来スフェロイド)を形成することで、クローン化した癌幹細胞株を樹立できると考えた。

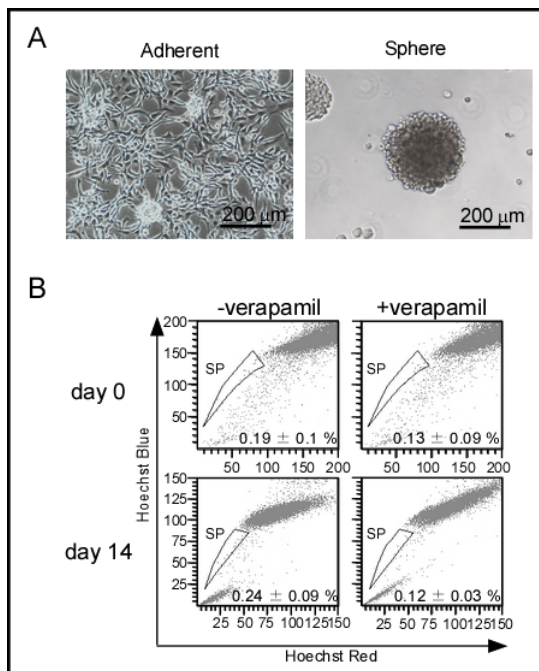


図 2 U87MG 細胞における SP 細胞解析

これまでの研究から、多くの癌幹細胞は、組織幹細胞同様に細胞周期を休止期(G0 期)に維持しており、積極的な増殖をしていないことが示唆されている。そこで、U87MG 細胞の細胞周期をフローサイトメーターにより解析した結果(図 3A)、G0 期、G1 期、S 期、G2/M 期の細胞の割合は、それぞれ 17.9%、63.1%、3.4%、11.7%であった。さらに、それぞれの細胞周期由来のスフェ

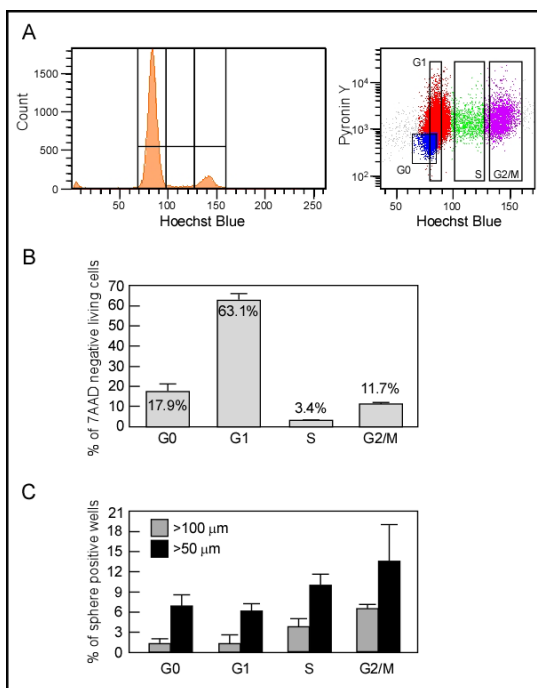


図 3 U87MG 細胞における単一細胞由来癌幹細胞株の樹立

ロイド形成について評価した。その結果、G0, G1 期の細胞よりも、S 期、G2/M 期の細胞の方が、スフェロイド形成効率が高くなる傾向が見られた。さらに、形成したスフェロイドを増殖培養することで、最終的に G0 期、S 期、G2/M 期由来の癌幹細胞株をそれぞれ 4 種類、8 種類、7 種類樹立した。一方、G1 期由来の癌幹細胞は、7 種類のスフェロイドが形成されたが、いずれのスフェロイドも継代途中で増殖がとまり、癌幹細胞株として樹立できなかった。

次に、各クローン株の doubling time を算出した結果(図 4A)、樹立した癌幹細胞株のうち、P4E8 細胞が最も高い増殖能を示した。また、限界希釈法を用いて癌幹細胞の存在率を計算したところ、親株の U87MG 細胞において 3.37% 存在する癌幹細胞が、樹立した癌幹細胞株(P4E8)においては、38.5%にまで増加していた(図 4B)。

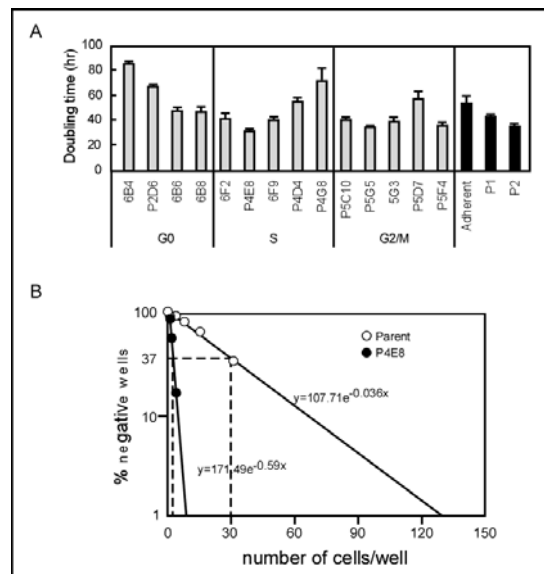


図 4 U87MG 細胞由来癌幹細胞株の増殖能と癌幹細胞の存在割合の算出

さらに、各クローンにおける各種マーカー遺伝子の発現について RT-PCR 法を用いて解析を行った(図 5)。その結果、P4E8 細胞において、癌幹細胞マーカーとして知られている Sox2 や Nestin 遺伝子の発現量が、親株に比べて特に増大しており、P4E8 細胞が癌幹細胞株であることが示唆された。また、作製した癌幹細胞株は、クローン間での増殖速度や各種マーカー遺伝

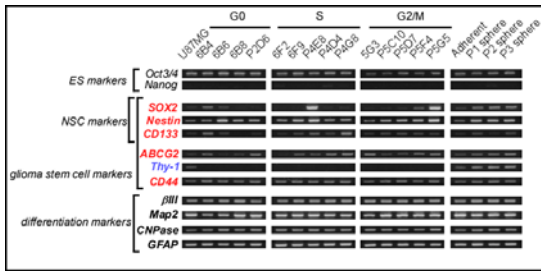


図 5 U87MG 細胞由来癌幹細胞株における各種マーカー遺伝子の発現解析

子の発現パターンが異なっていたことから、親株には、異なる種類の癌幹細胞が存在することが示唆された。さらに、癌幹細胞マーカーの発現を免疫染色法により検討した結果、P4E8 細胞では、親株には発現していない Nestin や SSEA-1 の発現が観察された(図6)。以上より、樹立した P4E8 細胞株が癌幹細胞であることが強く示唆された。

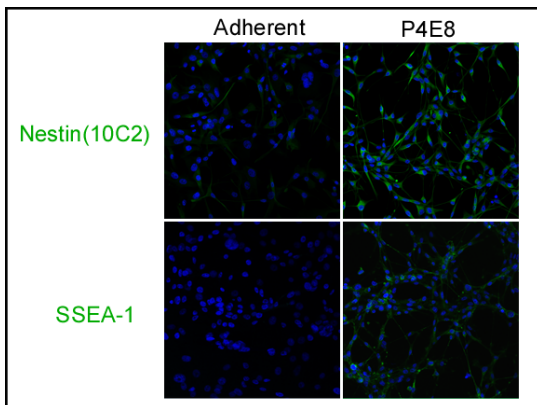


図 6 U87MG(P4E8)細胞における Nestin, SSEA-1 の発現

最後に、新たな癌幹細胞マーカーを見出すため、スフェロイド培養を行った P4E8 細胞と接着培養した親株との遺伝子発現差位解析を cDNA マイクロアレイを用いて行った。その結果、P4E8 細胞において 10 倍以上発現量の増加する遺伝子を 131 種類、10 倍以下に発現量の低下する遺伝子を 231 遺伝子同定した。癌幹細胞マーカーとして知られている Sox2 遺伝子や CXCR4 遺伝子は、P4E8 細胞においてのみ発現がみとめられ、FABP7 遺伝子及び Nestin 遺伝子は、親株と比べ P4E8 細胞において、それぞれ 17 倍及び 4.8 倍高発現していた。さらには、癌幹細胞にお

いて特異的に発現しているいくつかの細胞膜表面抗原も新たに見出すことができた。癌幹細胞特異的に発現する細胞膜表面抗原は、癌幹細胞治療を行うための有用なターゲットとなり得るため、本研究から、グリオーマ癌幹細胞選択的な治療法を確立するための有用な知見が得られた。

### 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)

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/anat2/>

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

丸山 正人 (MARUYAMA, Masato)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号:00399445

#### (2)研究分担者

加瀬 政彦 (KASE, Masahiko)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10309221

トリフォノフ ステファン (TRIFONOV, Stefan)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30598173

#### (3)連携研究者

櫻井 文教 (SAKURAI, Fuminori)

大阪大学・薬学部・准教授

研究者番号: 70370939