

令和 2 年 4 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07183

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞特異的に発現する新規バイオマーカーの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a novel biomarker specifically expressed in glioma stem cell.

研究代表者

丸山 正人 (Maruyama, Masato)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

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)：本研究では、我々がこれまで独自に見出したグリオーマがん幹細胞に発現する新規バイオマーカー (MSMP, PC3-secreted microseminoprotein) の発現解析を行い、グリオーマ患者に由来するがん幹細胞株や腫瘍組織において発現することを明らかにした。このことは、がん幹細胞において発現するMSMPが、血液中の単球を遊走させ、腫瘍微小環境の形成に寄与することで、腫瘍形成を促進していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腫瘍組織内にごく少数存在するがん幹細胞が、治療抵抗性を有し、がんの再発・転移に関連することが示唆されており、がん幹細胞を標的とした新規治療法の開発が期待されている。我々は、これまでに、グリオーマがん幹細胞に発現する治療標的分子を探索した結果、PC3-secreted microprotein (MSMP) が、高発現していることを明らかにした。本研究では、MSMPがグリオーマ患者由来がん幹細胞株やグリオーマ患者の腫瘍組織においても発現が見られたことから、がん幹細胞に発現するMSMPが、血管内の単球を遊走させ、腫瘍微小環境の形成に寄与することで、腫瘍形成を促進させていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of PC3-secreted microseminoprotein (MSMP) in glioma stem cells and indicated that MSMP was expressed in patient-derived glioma stem cell lines and human glioma tissues. These results suggested that MSMP expressed in glioma stem cells migrate peripheral blood monocytes from blood vessels to tumor tissues and contributed to the formation of tumor microenvironment.

研究分野：薬剤学

キーワード：がん幹細胞 グリオーマ MSMP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は、最も発生頻度の高い原発性脳腫瘍であり、中でもグリオブラストーマは、治療後の再発率がきわめて高く、外科的治療、放射線治療、テモゾロミドなどの化学療法を複合した治療を行っても、生存期間中央値は 14.6 カ月と非常に予後が悪い。近年、腫瘍治療後の転移・再発の原因として、がん幹細胞の存在が注目されている。がん幹細胞は、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、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、腫瘍全体を標的としていたため、治療抵抗性を有するがん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、がん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ものの、

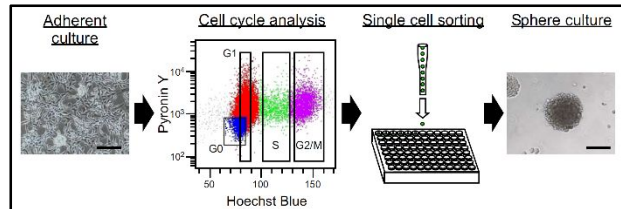


図1 がん幹細胞株の樹立

たものの、がん幹細胞の由来、特異性の高いバイオマーカー、腫瘍形成メカニズムなど、がん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、効率的な治療方法の開発には至っていない。これまでに、我々は、グリオーマ癌幹細胞をターゲットとした新規治療法を開発することを目的に、ヒトグリオーマ由来 U87MG 細胞株から、スフェロイド培養を用いて単一細胞由来のクローン化した U87MG がん幹細胞株を樹立した(図1)。樹立したがん幹細胞株のうち、マウスへ皮下移植した際、最も腫瘍形成能が高かった細胞株(P4E8)と親株である U87MG 細胞との遺伝子発現差異解析を行った結果、既存の癌幹細胞マーカーである SOX2 や Nestin 遺伝子以外にも、グリオーマ癌幹細胞株において、数百倍もの高い発現を示す複数の遺伝子を複数同定した。これらの中で、Microseminoprotein (MSMP)が、最も高い発現量を示すことを明らかにした。

2. 研究の目的

我々は、正常脳に発現していない MSMP が、樹立したグリオーマ癌幹細胞のモデル細胞において、高い遺伝子発現を示したことから、がん幹細胞に発現する MSMP がグリオーマ形成に重要な役割を担っているのではないかと考えた。そこで、本研究では、ヒトグリオーマ組織及び患者由来グリオーマがん幹細胞株における MSMP のタンパクレベルの発現を解析し、さらには、MSMP のグリオーマ形成における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、関西医科大学倫理委員会の承認(#2014106)を受けて行った。動物実験は、関西医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

(1) 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)で培養した。

P4E8 細胞及び患者由来グリオーマがん幹細胞株 (146 及び MD13 細胞) は、20 ng/μl の bFGF 及び EGF、N2 plus media supplement, B27 supplement を添加した DMEM/F12 を用いてスフェロイド培養した。

(2) 免疫染色

細胞を poly-L-ornithine, laminin でコーティングしたカバーガラス上に播種し、24 時間後に固

定・透過処理を行った。ブロッキング処理を行った後、1次抗体を4°Cで一晩インキュベートし、翌日に蛍光標識2次抗体で2時間処理した。核染色は、2 μM Hoechst33342 を室温で20分間処理した。画像は、LSM700 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) を用いて取得した。

組織染色は、パラフィン包埋されたグリオーマ患者由来の腫瘍組織を5 μm 厚の切片にし、脱パラフィン・水和処理を行った後、pH 6の20 mM クエン酸ナトリウム緩衝液中120°C 20分処理により抗原賦活化を行った。ブロッキング後、カバーガラス上に貼り付け、1次抗体で4°C 一晩処理、その後、ビオチン標識2次抗体で2時間処理を行った。その後、ABC kit (vector laboratories) 及び ImmPACT DAB (vector laboratories) を用いて検出を行った。画像は、Eclipse Ni 顕微鏡 (Nikon, Japan) を用いて取得した。

(3) 抗体作製

MSMP 抗体は、114-126 アミノ酸領域 (CKGGGPDPEWGSA) をペプチド合成したものを抗原とし、ウサギに免疫して作製した (Eurofins Genomics, Germany)。

(4) ウェスタンブロット

MSMP あるいはC末端に myc を結合させた MSMP-myc を発現する遺伝子を293細胞に発現させ、調整したライセートを SDS-PAGE で分離した。泳動後、タンパクを PVDF メンブレンに転写し、1次抗体で4°C 一晩処理、その後、HRP 標識2次抗体で2時間、室温で処理した。発光反応は、ECL prime detection system (GE Healthcare) を用いて行い、イメージアナライザー (LAS-4000, Fuji Film) を用いて検出した。

4. 研究成果

初めに、ヒトグリオーマにおいて MSMP が発現しているかどうかを検討するため、ヒトグリオーマ患者由来の腫瘍組織及び患者由来グリオーマがん幹細胞株における MSMP のタンパクレベルの発現解析に取り組んだ。MSMP は、これまでに報告された研究が少なく、ウェスタンブロット法に利用できる抗体が市販されていないため、MSMP のN末端から114-126番目のアミノ酸領域を抗原として、ポリクローナル抗体を新たに作製した。MSMP 遺伝子あるいは myc 標識した MSMP 遺伝子を293細胞に発現させてライセートを調製し、ウェスタンブロット法により発現を調べた結果、作製した MSMP 抗体は、MSMP 及び MSMP-myc のいずれのバンドも検出できた。一方、myc 抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果、MSMP-myc のみバンドが観察された(図2A)。

以上のことから、作製した MSMP 抗体は、外因性に強制発現させた MSMP をウェスタンブロットで検出できることが明らかとなった。そこで、U87MG, P4E8, 146, MD13 細胞のライセートを調製し、MSMP 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったものの、内因性の MSMP の発現は、検出することが出来なかった(図2B)。

そこで、免疫染色に用いることができる市販抗体を用いて内因性 MSMP の発現を解析した。

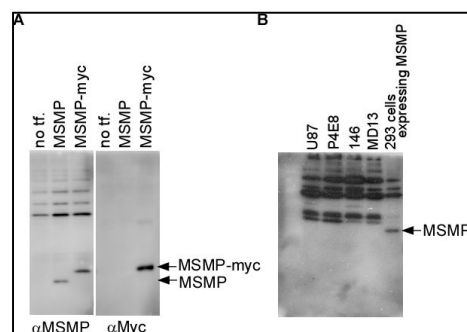


図2 ウェスタンブロット法による MSMP の発現解析

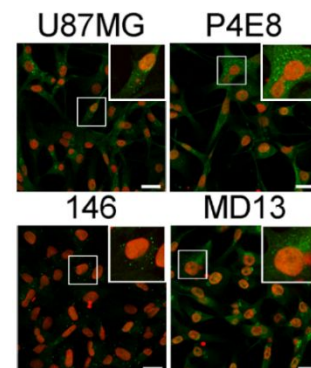


図3 グリオーマ患者由来がん幹細胞株における MSMP の発現核(赤)及び MSMP(緑)は、それぞれ Hoechst33342 及び MSMP 抗体を用いて染色した。

その結果、U87MG 細胞、P4E8 細胞、患者由来グリオーマがん幹細胞株 (146, MD13) のいずれにおいても、MSMP の発現が観察された。また、MSMP は細胞質中に点状のシグナルとして確認されたことから、分泌小胞に存在していることが示唆された (図 3)。

さらに、悪性度別に分類したヒトのグリオーマ組織において、MSMP の発現を免疫組織学的に解析した結果、MSMP は、グリオーマの悪性度に関わらず、発現していることが示された (図 4)。以上より、MSMP は、ヒトのグリオーマ由来の細胞株、患者由来がん幹細胞株、腫瘍組織において、タンパクレベルで発現していることを明らかにした。

次に、MSMP のグリオーマ形成における役割を調べるため、Crispr/Cas9 を用いた MSMP のノックアウト P4E8 細胞株の作製を試みた。3つの配列を標的として Cas9 による切断活性を調べた結果、1つがわずかに切断活性を示したものの、十分ではなく、ノックアウト P4E8 細胞の作成には至らなかった。MSMP は、cDNA の全長が 420bp と短いため、さらに下流の領域を、標的配列にすると、ノックアウト細胞を樹立できないと考えられたことから、Crispr/Cas9 による MSMP ノックアウト細胞は、作製できなかった。

近年、腫瘍内には、腫瘍関連マクロファージ (Tumor-Associated macrophage) が存在し、腫瘍微小環境を形成することで、腫瘍形成の促進に寄与していることが知られている。一方で、MSMP は末梢血中に存在する単球やリンパ球に対して遊走能を持つことが報告されていることから、がん幹細胞から分泌される MSMP が、末梢血中に存在する単球を腫瘍内へと遊走させることで、腫瘍微小環境の構成と腫瘍の進展に寄与している可能性が考えられた (図 5)。

そこで、MSMP の単球に対する遊走能を調べるため、ヒト MSMP 組換えタンパク質の調製を試みた。ヒト MSMP は、139 個のアミノ酸残基で構成されており、36 番目まではシグナルペプチドとして機能するため、37-139 番目の領域の組換えタンパク質を大腸菌で作成した。その結果、予想された分子量である約 11kDa の組換え MSMP タンパク質の調製に成功した。そして、精製した MSMP のヒト単球由来 THP-1 細胞に対する遊走能を調べた結果、MSMP は THP-1 の遊走能に影響を及ぼさなかった。今回、作製した組み換えタンパク質は、設計上、天然の MSMP に比べて、N 末端に数個のアミノ酸が余計に付加されている。これが、MSMP の受容体への結合に影響を及ぼしている可能性があるため、今後は、付加されたアミノ酸の影響を除いた検討を進める必要がある。以上の成果は、現在、投稿準備中である。

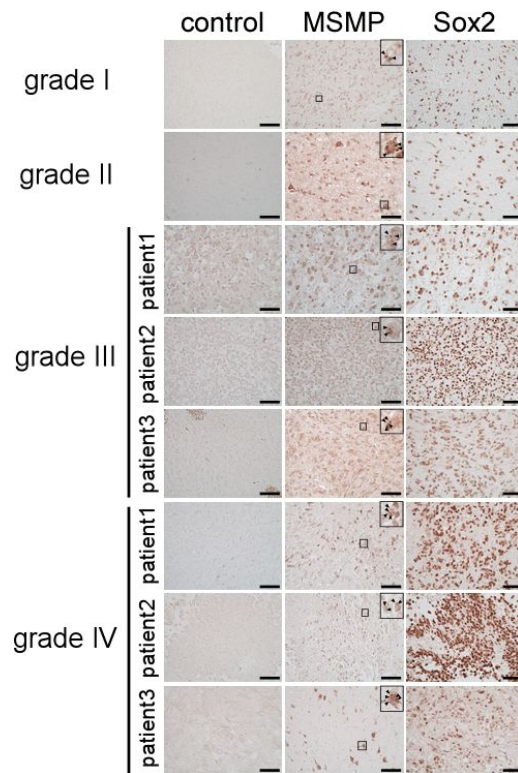


図 4 グリオーマ組織における MSMP 及び Sox2 の免疫組織染色像

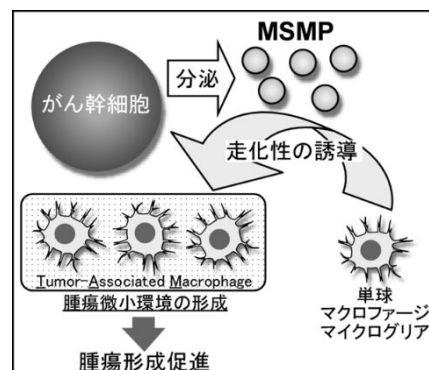


図 5 がん幹細胞に発現する MSMP の役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwata Ryoichi, Lee Joo Hyoung, Hayashi Mikio, Dianzani Umberto, Ofune Kohei, Maruyama Masato, Oe Souichi, Ito Tomoki, Hashiba Tetsuo, Yoshimura Kunikazu, Nonaka Masahiro, Nakano Yosuke, Norian Lyse, Nakano Ichiro, Asai Akio	4. 巻 22
2. 論文標題 ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 333-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/noz204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 岩田 亮一、丸山 正人、大舟 晃平、中野 洋輔、大江 総一、林 美樹夫、吉村 晋一、埜中 正博、浅井 昭雄	4. 巻 28
2. 論文標題 転移性脳腫瘍とがん幹細胞との関連	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 サイトメトリリーサーチ	6. 最初と最後の頁 13~18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.18947/cytometryresearch.28.1_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryoichi Iwata, Masato Maruyama, Tomoki Ito, Yosuke Nakano, Yonehiro Kanemura, Taro Koike, Souichi Oe, Kunikazu Yoshimura, Masahiro Nonaka, Shosaku Nomura, Tetsuo Sugimoto, Hisao Yamada, Akio Asai	4. 巻 50
2. 論文標題 Establishment of a tumor sphere cell line from a metastatic brain neuroendocrine tumor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 211-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-017-0160-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山正人, 中野洋輔, 岩田亮一, 西村拓也, 加瀬政彦, 杉本哲夫
2. 発表標題 ヒトグリオブラストーマU87MG細胞から樹立した癌幹細胞様細胞に高発現する遺伝子の探索
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山 正人, 中野 洋輔, 岩田 亮一, 西村 拓也, 加瀬 政彦, 杉本 哲夫
2. 発表標題 ヒト神経膠芽腫由来U87MG細胞から樹立した高い腫瘍形成能を持つスフェロイドはPC3-Secreted Microprotein を高発現する
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村拓也, 丸山正人, 中野洋輔, 加瀬政彦, 杉本哲夫
2. 発表標題 SLC24A3遺伝子は、U87MG細胞由来Tumor Sphereに高発現する
3. 学会等名 第65回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中野 洋輔 (Nakano Yousuke) (40776530)	関西医科大学・医学部・助教 (34417)	
研究分担者	岩田 亮一 (Iwata Ryoichi) (60580446)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	