

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790996
 研究課題名（和文）小児脳腫瘍における腫瘍幹細胞分離・培養とテーラーメイド治療の開発

研究課題名（英文）

The isolation and culture of cancer stem cells and the development of tailor-made therapies for malignant pediatric brain tumors

研究代表者

香川 尚己（KAGAWA NAOKI）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：50444542

研究成果の概要：

脳腫瘍の臨床検体から腫瘍幹細胞を分離・培養する技術を確認し CD133 陽性細胞の陽性率と病理組織標本での幹細胞マーカーとの比率を検討した。CD133 陽性細胞より採取した RNA から高発現している分子候補を選択し tumor sphere-initiating cell を濃縮するマーカーを得た。得られた分子を抑制することにより cell motility は上昇し細胞侵潤などに関係すると想像され、腫瘍幹細胞を抑制する分子標的薬剤の開発の可能性を広げると考える。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

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：(1)髄芽腫・PNET (2)腫瘍幹細胞 (3)分離・培養 (4)複製・分化 (5)神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

小児脳腫瘍は小児悪性腫瘍の中で白血病に次いで発生が多く、第2位の発生数であるが未だ予後不良な症例が多い。また、近年の幹細胞研究の進歩には目覚ましいものがあるが、悪性脳腫瘍内の癌細胞株にも組織内幹細胞と同様の自己複製能、多分化能、腫瘍形成能を有する少数の細胞(腫瘍幹細胞)が認められている。成人の神経膠腫には神経幹細胞の性質を有する細胞群が存在すると報告されているが、小児期に発生する脳

腫瘍にもこのような神経幹細胞マーカーが発現している。小児脳腫瘍の多くは正中脳室付近に多発することより、小児脳腫瘍の発生にも幹細胞の性質を有する細胞群の関与が推測されている。幹細胞研究が進歩するにつれ、脳腫瘍および脳腫瘍細胞株より多分化能、薬剤耐性能、腫瘍形成能を有する少数の腫瘍幹細胞を分離する技術が開発されてきており、癌治療の重要な標的としてその性状解析を行っていくことは、腫瘍の発生過程を理解し腫瘍に効果的な治療法

を開発していくために必要かつ有効なことを考える。我々は、このような腫瘍幹細胞の性質を調査し、その癌化にメカニズムを解明することが、最も有効な治療法を見出すことに繋がり、脳腫瘍の治療成績の向上を求めんとするものである。

2. 研究の目的

近年の幹細胞研究の進歩には目覚ましいものがあるが、悪性脳腫瘍内の癌細胞株にも組織内幹細胞と同様の自己複製能、多分化能、腫瘍形成能を有する少数の細胞（腫瘍幹細胞）が認められている。小児期に発生する脳腫瘍にも神経幹細胞マーカーが発現しており、小児脳腫瘍の多くは正中脳室付近に多発することより、小児脳腫瘍にも神経幹細胞の関与が推測されている。脳腫瘍に治療を効率よく治癒および縮小に導くためには、このような腫瘍幹細胞と考えられる細胞群の制御が不可欠と思われる。幹細胞研究が進歩するにつれ、脳腫瘍および脳腫瘍細胞株より多分化能、薬剤耐性能、腫瘍形成能を有する少数の腫瘍幹細胞を分離する技術が開発されてきており、癌治療の重要な標的としてその性状解析を行っていくことは、腫瘍の発生過程を解明し腫瘍に効果的な治療法を開発していくために有効なことを考える。我々は多くの脳腫瘍でマイクロアレイ法を中心とした遺伝子解析を行い予後や治療反応性との関係を探ってきた。我々の遺伝子・染色体解析で得られた因子が腫瘍細胞の多分化能、薬剤耐性能、腫瘍形成能にどのように関わるか検討することは重要と思われる。より高純度な幹細胞の分離・培養により脳腫瘍幹細胞の性質、治療抵抗性の解明や分子標的治療の可能性に寄与するものと期待する。我々は、腫瘍幹細胞において、このような遺伝子異常が存在し自己複製能、薬剤及び放射線感受性に関与していることを追跡することにより予後不良因子を同定し、脳腫瘍に対するテーラーメイドな治療へ応用できることを期待するものである。

3. 研究の方法

(1) 脳腫瘍サンプルからの腫瘍幹細胞の分離・同定

脳腫瘍手術例から腫瘍検体を得、

neurotrophic factor を含んだ無血清培地にて培養を行った。FACS を使用し、CD133 の表面マーカーの発現等を利用して、腫瘍幹細胞の分離・同定を行った。また、病理組織標本を利用し免疫組織化学にて幹細胞マーカーの陽性率を検討した。

(2) 腫瘍幹細胞を使った自己複製能、多分化能などの評価

得られた腫瘍幹細胞から、FACS を用いて CD133 陽性細胞とそれ以外に分離し、それぞれの多分化能と自己複製能などについて調査した。自己複製能については、**doubling time** や **MIB-1-index** などを指標にした。多分化能については、**CD133** や **Nestin**、**Musashi1** などの免疫染色、**神経・グリア系マーカー**である、**GFAP**、**MAP2**、**TUJ1** などを用いて免疫組織化学にて評価を行った。

(3) 悪性脳腫瘍における腫瘍内幹細胞の分離・培養と WT1 蛋白発現との関連性

脳腫瘍のサンプルから腫瘍幹細胞を分離・培養を行い、**Nestin** および **Musashi** 陽性細胞、**CD133** 陽性細胞と **WT1** 蛋白の発現との関連性を検討した。【方法】悪性脳腫瘍 (**glioblastoma**, **anaplastic astrocytoma**, **medulloblastoma** など) から採取したサンプルを幹細胞培養液で培養し浮遊細胞塊の形成を観察した。幹細胞マーカーの発現および多分化能、**WT1** 蛋白の発現を蛍光抗体法により検討した。また、得られた病理組織標本においても幹細胞マーカーおよび **WT1** の発現およびその特徴を免疫組織染色などを中心に検討した。

(4) 脳腫瘍検体より得られた腫瘍幹細胞群でのマイクロアレイシステムを利用した遺伝子発現の解析と新規幹細胞マーカーの同定

膠芽腫の症例の腫瘍検体から分離した **CD133** 陽性細胞、陰性細胞より採取した RNA を用いて **CD133** 陽性腫瘍幹細胞分画に高発現している分子候補を選択した。候補分子の発現と **CD133** の発現との関係を検討し、

tumor sphere-initiating cell を濃縮するマーカーを選択し、その性質を検討した。

4. 研究成果

(1) 悪性脳腫瘍から採取した検体を培養し tumor sphere の形成を確認し、CD133 陽性細胞をほぼ全例に認めた。それぞれ多分化能を有し neural stem cell 様の性質を持つことを確認した。また、病理組織標本の免疫組織化学にて CD133、Nestin、Musashi1 などの抗体を使用し、幹細胞マーカーの発現を腫瘍の一部に認めた。

(2) FACS にて CD133 陽性細胞とそれ以外に分離し、それぞれの多分化能と自己複製能などについて調査した。神経膠芽腫の臨床検体から得られた細胞塊を FACS にて解析し、CD133 陽性細胞の陽性率を検討し、CD133 陽性分画だけでなく CD133 陰性細胞の中にも腫瘍形成能を有する細胞が存在した。また、CD133 陽性細胞であっても培養を続けることにより神経細胞やグリア細胞への分化を始める細胞も存在した。

(3) 得られた悪性脳腫瘍において、tumor sphere の形成を確認した。Nestin, Musashi, CD133 陽性細胞をほぼ全例に認めた。それぞれ多分化能を有し neural stem cell 様の性質を持つことを確認した。また、病理組織標本では幹細胞マーカーの発現を腫瘍の一部に認めた。WT1 蛋白は、腫瘍内血管周囲の細胞増殖部位や高悪性度の部位に発現が強く認められた。腫瘍幹細胞と WT1 蛋白との発現の間には何らかの関連性を示唆する可能性があった。

(4) 膠芽腫の症例の腫瘍検体から分離した CD133 陽性細胞、陰性細胞より採取した RNA を用いて signal sequence trap 法および microarray 法により、CD133 陽性腫瘍幹細胞分画に高発現している分子候補を選択した。候補分子の発現と CD133 の発現との関係を検討し、tumor sphere-initiating cell を濃縮するマーカーを選択した。得られた分子を抗体にて抑制することにより cell motility は上昇し細胞侵潤などに関係すると想像された。腫瘍幹細胞により特異的なマーカーを同定し、その特性を精査することにより、腫瘍幹細胞を抑制する分

子標的薬剤の開発の可能性を広げ、更なる腫瘍幹細胞研究に寄与することが出来ることを考える。

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)

[学会発表](計9件)

香川尚己、悪性神経膠腫における新規癌幹細胞マーカー同定と分子標的治療への試み、第26回日本脳腫瘍学会、2008年11月30日、松山

香川尚己、膠芽腫における新規癌幹細胞マーカー同定の意義、第9回日本分子脳神経外科学会、2008年8月30日、京都

香川尚己、髄芽腫治療における外科治療の影響と役割について、第23回日本小児がん学会、2007年12月16日、仙台

香川尚己、悪性脳腫瘍における腫瘍内幹細胞の分離・培養と WT1 蛋白発現との関連性、第25回日本脳腫瘍学会、2007年12月10日、東京

香川尚己、Relationship between existence of cancer stem cell and expression of WT1 protein in malignant brain tumors、第12回グリア研究会、2007年11月17日、名古屋
香川尚己、髄芽腫の治療成績と晩期障害を鑑みてのフォローアップ、第66回社団法人日本脳神経外科学会総会、2007年10月5日、東京

香川尚己、髄芽腫治療における初回治療の影響と長期フォローアップ、第35回日本小児神経外科学会、2007年5月31日、木更津(千葉)

Naoki Kagawa, Estimation of the risk, the reliability and problems about neuroendoscopic procedures for brain tumors in the third ventricle、Neuroendoscopy 2007、2007年5月9日、ベルサイユ(フランス)

香川尚己、内視鏡的生検術による松果体部 germinoma の組織診断の問題点と c-kit の有用性、第25回日本脳腫瘍病理学会、2007年4月20日、熊本

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.n surg.med.osaka-u.ac.jp/school/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

香川 尚己 (KAGAWA NAOKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 50444542