

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500335

研究課題名（和文）グリオーマ幹細胞バンクの構築と“stem cell phenotype”の解析

研究課題名（英文） Establishing glioma stem cell library together with its ontogenic and phenotypical analysis of glioma

研究代表者

横尾 英明（YOKOO HIDEAKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40282389

研究成果の概要（和文）：

抗ヒトCD133/prominin 1抗体、抗ラットCD133/prominin 1抗体、抗ヒトNG2/CSPG4抗体を開発した。ヒトグリオーマ細胞を幹細胞分離培地で培養を行い、それを標本化して幹細胞ライブラリーを構築した。多層性ロゼットを有する胎児性腫瘍の染色体19q13.42領域の解析や、IDH1遺伝子変異に着目したグリオーマの系譜の解析をおこなった。脳腫瘍を好発するS100β-v-erbBトランスジェニックラットの解析をおこなった。

研究成果の概要（英文）：

Antibodies to human CD133/prominin1, rat CD133/prominin1, human NG2/CSPG4 were developed. Glioma stem cell library was developed by culturing human glioma cell under stem cell condition. Genetic analysis of chromosome 19q13.42 in embryonal tumors with multilayered rosettes, and IDH1 in oligodendroglial tumors was carried out. S100β-verbB transgenic rat prone to glioma was analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経病理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳腫瘍、グリオーマ、免疫組織化学、腫瘍幹細胞、遺伝子改変ラット、EGFR、CD133、NG2

1. 研究開始当初の背景

現在わが国では国民の3人に1人ががん

で死亡する時代となり、がん制圧に向けた新たな取り組みが強く求められている中、がん

幹細胞仮説が近年にわかに注目を集めている。これまで無秩序に増殖する一様な細胞集団と思われていた腫瘍が、実は少数の幹細胞から生み出され、階層性のある集団を形成しているという学説の正しさが実験レベルで次々に証明されつつある。その過程で提示された「がん幹細胞は治療抵抗性で、がん幹細胞がごくわずかでも残存するとがんは再発してしまう」という作業仮説は、がん幹細胞が今後のがん研究の主要な対象になるであろうことを強く予感させるものである。また、がんの臨床材料から分離されたがん幹細胞は、分化を促す環境下では元来の腫瘍組織型によく類似した腫瘍細胞集団を再構築することが実験的に示されており、幹細胞ごとの個性、いわば“stem cell phenotype”の存在が示唆されている。

がん幹細胞の同定手段は現在のところフローサイトメトリーにほぼ限定される。同法では生きた細胞をばらばらにして取り扱うので、当然のことながら病理組織学的解析と相容れない問題が生ずる。一般に摘出量に限りのある脳腫瘍の臨床材料ではなおさらのことである。また高価な装置と専門の技術者を要する点も研究進展の上でネックになっている。もしもルーチンの病理検体でがん幹細胞を簡便に同定できる手法が開発されれば、がん幹細胞研究は飛躍的に進歩することが期待されるが、現在のところはまだ実現されていない。

2. 研究の目的

上記のような視点から出発した本研究であるが、本研究課題を立案し、研究費が採択された直後より、脳腫瘍の基礎研究を取り巻く環境にはいくつかの大きな動きがあった。特に大きなものとして、グリオーマ発生の引き金となる重要な分子遺伝学的事象(IDH1/2

変異、BRAF 融合遺伝子など)が判明したことが挙げられる。また我々が樹立した S100 β -v-erbB トランスジェニックラットは、グリア細胞において恒常的に EGFR シグナル伝達系を活性化させた遺伝子改変動物であるが、これが非常に高い浸透度で脳腫瘍を起こすことが判明し、高い腫瘍原性のある分子遺伝学的事象としての位置付けが確立された。これらの知見を踏まえ、腫瘍の起源や性質を普遍的な幹細胞マーカーの観点で追及するだけでなく、当該の遺伝子異常を指標にしたほうが腫瘍の性格付けが容易という状況が急速に生まれてきた。よって本研究においては、幹細胞と腫瘍原性遺伝子変異の両者の観点からグリオーマの起源や phenotype の解析を進めていくことにした。

3. 研究の方法

具体的には以下のような方針で研究をおこなった。

- (1)ホルマリン固定パラフィン包埋切片でも安定して使用可能なCD133/prominin 1抗体をはじめとする幹細胞関連マーカーを開発し、characterizationを推し進める。
- (2)ヒトグリオーマ細胞を幹細胞分離培地で培養を行い、それを標本化して幹細胞バンクを構築し、その形質を解析する。
- (3)脳腫瘍原性遺伝子変異に着目した脳腫瘍の病理学的解析をおこなう。
- (4)脳腫瘍を好発するS100 β -v-erbBトランスジェニックラットの解析をおこなう。

4. 研究成果

(1)抗体作製について

ヒトCD133/prominin 1の部分合成ペプチドを免疫原とした抗体の作製を試み、ホルマリン固定パラフィン包埋切片で安定して染色可能なものを樹立した。幹細胞条件で培養した

ヒトグリオーマ細胞 (tumor sphere) をホルマリン固定パラフィン包埋した材料において染色すると、通常のグリオーマ細胞とは明らかに形態の異なる大型細胞が陽性像を示した。また陽性細胞はsphereから突出するように存在したり、sphere内にて集簇して認められる傾向があった。これらの陽性細胞を免疫電顕法で観察したところ、偽足様の微細ヒダ状突起を有する細胞の細胞膜に一致して陽性所見を認めた。この抗体にラベルされる細胞が真に幹細胞であるかどうかは不明であるが、通常のグリオーマ細胞とは大きく異なる細胞形態をしており、グリオーマ内のsubpopulationをなす細胞であることが示唆された。一方、この抗体はグリオーマの臨床材料(パラフィン切片)では1切片あたり平均して0-数個の陽性細胞を認めるのみで、多くの腫瘍細胞は陰性だった。ヒトグリオーマにおいてCD133陽性細胞の出現頻度については諸説あるが、我々のデータではかなり頻度が低いという結果だった。また同抗体はフローサイトメトリーには使用できなかった。

ヒト抗体と同様な手法を用いてラットCD133/prominin 1に対しても抗体作製を試み、パラフィン切片で使用可能なものを樹立した。

また、ヒトグリオーマの発生母細胞の候補としてpolydendrocyte (NG2細胞)が注目されつつあることから、ヒトNG2/CSPG4抗体の作製を試みた。その結果、凍結切片では非常に良好な染色性が得られ、パラフィン切片では染色性が落ちたものの、グリオーマにおいて高率に陽性となることが判明した。NG2細胞はグリア前駆細胞という名に反して、実際のところはマクログリアの総数とはあまり変わらない

(若干少ない程度)数が存在することがヒト脳でも判明し、グリオーマの発生母地としてさらに詳細な解析を要する対象であることが示唆された。

(2) グリオーマ幹細胞ライブラリーの構築

まず最初に株化されているヒトグリオーマ(A172、U251、M87)を対象に、幹細胞分離条件で培養をおこない、tumor sphereを作らせてセルブロック標本作製した。この検体は上記の抗体作製の際にも活用した。さらに幹細胞条件でのヒトグリオーマの外科材料を培養系に移す実験を行ったが、これに関しては継代困難なものが多く、結果的に症例数が伸び悩んだ。

(3) 脳腫瘍原性遺伝子変異の解析

びまん性グリオーマや二次性膠芽腫では多くの症例でIDH1/2の変異が近年明らかにされており、今後発生母細胞の解析の上で重要な研究対象となることはほぼ間違いない。そこでLAMP法による簡便なIDH1の変異解析法を考案した。

多層性ロゼットを有する胎児性腫瘍(ETANTR、髓上皮腫、AT/RT、未熟奇形腫)において染色体19q13.42の解析を行い、前二者はこの遺伝子座に局在する特定の遺伝子に活性化が生じていることを明らかにした。細胞系譜を追跡することに加えて、分子遺伝学的手法が腫瘍の起源を探る上で有用であることが示された。

退形成性乏突起膠腫の一例で、著明な神経細胞への分化を示すものを経験し、それぞれの細胞系譜を分子遺伝学的に検討した。その結果、IDH1遺伝子変異を両成分に認め、腫瘍の発生起源を探る上で有用だった。

(4) S100β-v-erbBトランスジェニックラットの解析

グリオーマの発生母細胞の研究の一環として、これまで対象としてきたヒト脳腫瘍に加えて、本研究代表者を含むグループが樹立したS100β-v-erbBトランスジェニックラットを研究対象に加え、相互の比較や知見のフィードバックを行うことで、より精度の高い研究体制の構築を目指した。

ヒトグリオーマにおいてEGFRシグナル伝達系の異常活性化はしばしば起こるが、活性化の程度と形成される腫瘍の形質の比較研究はほとんどおこなわれておらず、一定した結論が得られていない。そこでトランスジーンをホモ接合性およびヘテロ接合性に組み込んだ個体を創出し、EGFRシグナル伝達系の強度を2段階に差をつけて比較を行った。その結果、ヘテロ群は発症年齢が有意に遅くなり、形成された脳腫瘍の増殖能が低下していた。またヘテロ群の脳腫瘍は増殖が遅いために、発生母地から腫瘍が進展していく過程を追跡できることが判明した。この実験で、EGFRシグナル伝達系はdoseとrateが発生してくる脳腫瘍の生物学的態度に影響することが明らかになるとともに、脳腫瘍幹細胞から進行段階のグリオーマに至るまでの過程を研究する上で有益なモデルとなることが示唆された。

グリオーマの発生母細胞としてオリゴデンドロサイト前駆細胞(NG2細胞)が注目されている。我々が保有するグリオーマ好発トランスジェニックラットに発生した脳腫瘍においてNG2抗原がほぼ全例で陽性となることを明らかにした。

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12件)

① Nobusawa S, Yokoo H, et al. Analysis of chromosome 19q13.42 amplification in embryonal brain tumors with ependymoblastic multilayered rosettes. Brain Pathology. 査読有(in press)

② Tanaka Y, Nobusawa S, Yagi S, Ikota H, Yokoo H, Nakazato Y. Anaplastic oligodendroglioma with ganglioglioma-like maturation. Brain Tumor Pathol. 査読有(in press)

③ 信澤純人、横尾英明. GliomaにおけるIDH1/2 遺伝子変異. Brain and Nerve. 査読有 63(12):1378-1386, 2011

④ Ikota H, Tanaka Y, Yokoo H, Nakazato Y. Clinicopathological and immunohistochemical study of 20 choroid plexus tumors: their histological diversity and the expression of markers useful for differentiation from metastatic cancer. Brain Tumor Pathol. 査読有 28(3): 215-221, 2011

⑤ Nagaishi M, Yokoo H, Hirato J, Yoshimoto Y, Nakazato Y. Clinico-pathological feature of pilomyxoid astrocytomas: Three case reports. Neuropathology. 査読有 31(2):152-157, 2011

⑥ Ikota H, Nobusawa S, Tanaka Y, Yokoo H, Nakazato Y. High-throughput immunohistochemical profiling of primary brain tumors and non-neoplastic systemic organs with a specific antibody against

the mutant isocitrate dehydrogenase 1 R132H protein. Brain Tumor Pathol. 査読有 28(2): 107-114, 2011

⑦ 横尾英明、中里洋一. 明細胞性腫瘍. 病理形態学キーワード. 病理と臨床臨時増刊号、査読無 28, 420-421, 2010

⑧ 磯田浩二、山崎博子、横田真知子、横尾英明、中里洋一. 大型パラフィン包埋標本作製における工夫. 病理と臨床, 査読有 28(12):1315-1317, 2010.

⑨ 横尾英明. 抗ヒト Olig2 抗体の開発 - 着想から市販化までを振り返る -. Neuro-oncology の進歩. 査読無 19(1), 71-75, 2010.

⑩ Nagaishi M, Tanaka Y, Iwatate K, Yokoo H, Ueki K, Hyodo A, Nakazato Y. Polar spongioblastoma: A high-grade glioma that does not contain the IDH1 mutation or 1p/19q LOH. Neuropathology, 査読有 30(5): 547-552, 2010.

⑪ 横尾英明, 田中優子, 信澤純人, 中里洋一, Hiroko Ohgaki. 【脳腫瘍研究の最前線 遺伝子解析から治療まで】脳腫瘍を好発する S100 β -v-erbB トランスジェニックラットの解析. Brain and Nerve. 査読無 61(7): 765-772, 2009

⑫ Rhee W, Ray S, Yokoo H, Hoane ME, Lee CC, Mikheev AM, Horner PJ, Rostomily RC. Quantitative analysis of mitotic Olig2 cells in adult human brain and gliomas: implications for glioma histogenesis and biology. Glia, 57(5): 510-523, 2009

〔学会発表〕(計 11 件)

① 横尾英明、信澤純人、田中優子、伊古田勇人、中里洋一、Ohgaki Hiroko. S100 β -v-erbB トランスジェニックラットに発生する脳腫瘍の解析: ヘテロ接合性個体の長期観察. 第 52 回日本神経病理学会、2011. 6. 2、京都市

② 伊古田勇人、信澤純人、田中優子、横尾英明、中里洋一. 原発性脳腫瘍および全身臓器における変異型イソクエン酸脱水素酵素 1 発現の免疫組織化学的網羅解析. 第 29 回日本脳腫瘍病理学会、2011. 5. 20、東京都江戸川区

③ 横尾英明. 招待講演「脳腫瘍病理: 世界に活躍する日本人」抗ヒト Olig2 抗体の開発. 第 100 回近畿脳腫瘍病理検討会記念大会. 2010. 10. 23、大阪市

④ 横尾英明、信澤純人、田中優子、伊古田勇人、中里洋一. S100 β -v-erbB トランスジェニックラットに発生する脳腫瘍の解析. 第 57 回北関東医学会、2010. 10. 7、前橋市

⑤ 横尾英明. 病理診断における遺伝子解析の意義: 脳腫瘍. 日本病理学会近畿支部夏期病理診断セミナー、2010. 8. 22、京都市

⑥ 横尾英明. S100 β -v-erbB トランスジェニックラットに発生する脳腫瘍の解析. 新潟脳神経研究会特別例会、2010. 6. 9、新潟市

⑦ 横尾英明、田中優子、信澤純人、永石雅也、中里洋一、Hiroko Ohgaki. S100 β -v-erbB トランスジェニックラットに発生するグリオーマは NG2/CSPG4 を発現する. 第 28 回日本脳腫瘍病理学会、2010. 5. 21、大阪市

⑧ 横尾英明、新井基展、中里洋一. LAMP 法を用いたグリオーマにおける IDH1 遺伝子変異の検出. 第 99 回日本病理学会、2010. 4. 28、東京都新宿区

⑨ 横尾英明. シンポジウム「神経病理の更なる発展に向けて」抗体作製による研究. 第 51 回日本神経病理学会、2010. 4. 23、東京都千代田区

⑩ 横尾英明. ワークショップ：脳腫瘍の基礎研究－臨床病理の立場から－パラフィン切片で使用可能な抗体の開発. 第 27 回日本脳腫瘍病理学会、2009. 5. 9、福岡市

⑪ 横尾英明、田中優子、佐々木惇、中里洋一. パラフィン切片で使用可能なラット CD133/prominin 1 抗体の作製. 第 98 回日本病理学会、2009. 5. 3、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 英明 (YOKOO HIDEAKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40282389

(2) 研究分担者

中里 洋一 (NAKAZATO YOICHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10106908
(H21)

佐々木 惇 (SASAKI ATSUSHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80225862
(H21)

石内 勝吾 (ISHIUCHI SHOGO)
琉球大学・医学部・教授
研究者番号：10312878
(H21)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：