

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23日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591880

研究課題名（和文） 悪性脳腫瘍幹細胞における薬剤耐性機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文） Investigation of mechanisms of drug resistance in malignant brain tumor stem cells

研究代表者

小林 啓一 (KOBAYASHI KEIICHI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：70406990

研究成果の概要（和文）：

40 症例の悪性神経膠腫摘出標本から脳腫瘍幹細胞 (Brain tumor stem cell, BTSC) の樹立を試み、培養 16 例、sphere 形成 10 例、nestin 陽性 BTSC 樹立見込みは 4 株であった。樹立 BTSC 株の X01S はマウスに脳腫瘍を形成し、膠芽腫に対する標準治療薬である temozolomide (TMZ) 治療や細胞死誘導分子標的治療に *in vitro* では強い耐性を示したが、マウス脳腫瘍モデルでは TMZ 治療により延命が認められた。MGMT プロモーター領域のメチル化は陽性で、複数のシグナル経路の制御が総合的に作用していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Forty malignant glioma specimens were subjected to tissue culture to establish new clones of brain tumor stem cells (BTSC) in our laboratory, of which 10 samples formed neurosphere and 4 are expected to established as BTSC expressing stem cell markers, such as nestin. X01S, an established BTSC clone, developed intracerebral tumors when inoculated, and was resistant to temozolomide (TMZ) as well as apoptosis-inducing targeted therapeutics *in vitro*, whereas TMZ elongated survival of mice bearing intracerebral X01S xenografts. MGMT gene promoter was methylated in three out of four BTSC cells including X01S, suggesting that multiple complex pathways might be involved in regulation of TMZ sensitivity in BTSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脳腫瘍幹細胞、悪性脳腫瘍、薬剤耐性、neurosphere、CD133、temozolomide、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、自己複製能と多分化能を併せ持つ幹細胞の存在が明らかになるとともに、幹細胞を用いた再生医学への応用に関する研究が広く行われるようになってきた。幹細胞は神経系では神経幹細胞が同定されている。腫瘍

系を用いた再生医学への応用に関する研究が広く行われるようになってきた。幹細胞は神経系では神経幹細胞が同定されている。腫瘍

細胞の中にも、一部に自己複製能を保ち、造腫瘍形成能の高い幹細胞の性格をもつ細胞群の存在が示唆され、このような無制限に分裂可能な能力をもつ“癌幹細胞”の概念が注目を集めている。

(2) 脳腫瘍においても、悪性脳腫瘍の代表である神経膠腫(glioma)の細胞株や膠芽腫・髄芽腫などの摘出腫瘍から脳腫瘍幹細胞(brain tumor stem cell; BTSC或いはbrain tumor stem-like cells)が分離培養可能であることが報告された。BTSCは、マウスなどに移植すると腫瘍を形成する造腫瘍性があり、ニューロン、星細胞、あるいは乏突起膠細胞などのグリア細胞への多分化能を維持するとともに、高度の自己複製能を持ち、腫瘍化に関わる遺伝子異常を伴う性質を持つ細胞と考えられている。このような細胞は、成長因子のEGFとFGF2を添加した培地で培養すると神経幹細胞と同様にneurosphereを形成し、神経前駆細胞のマーカーであるCD133陽性細胞という特徴を有する。

(3) 重要な点は、BTSCは放射線や抗癌剤等の治療への抵抗性を示す性質をもち、悪性脳腫瘍の治療耐性の一因となる可能性である。癌幹細胞は、その子孫である腫瘍に分化していく細胞に比べると一般に分裂速度が遅く、抗癌剤の作用が及びにくいG0期の分画が多いこと、薬剤排泄機能を担うABCカセットを含む細胞膜トランスポーターの発現、DNA修復機構の亢進やapoptosisへの耐性を示すと考えられている。これまで、gliomaのCD133陽性BTSCで、glioma治療に使用されるtemozolomide (TMZ)などの抗癌剤に耐性を示し、薬剤耐性関連遺伝子や、apoptosis抑制遺伝子のmRNA発現が有意に亢進していたとの報告が散見される。

(4) 放射線治療や化学療法に対し、BTSCから分化し形成された腫瘍細胞が感受性を示す場合でも、BTSCは生存して再び腫瘍細胞を産生することで腫瘍の再発をきたすと考えられる。即ち、治療上BTSCを有効に傷害できる治療でなければ、腫瘍の再発・再増大は免れないことになるため、BTSC、或いはこの細胞における耐性規定因子そのものが薬剤耐性を克服する重要な細胞・分子標的となりえると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ヒト glioma 細胞株及び悪性 glioma の手術摘出標本から初代培養として BTSC を培養、樹立する。

(2) これらの細胞を使用し、TMZ を始めとする化学療法剤への耐性の有無を *in vitro* で

検討する。また、分子標的治療薬などに対する耐性についても同様に検討する。

(3) 更に、これらの BTSC 細胞を移植することで、マウス脳腫瘍モデルの確立を図り、*in vivo* における治療耐性の有無を検証する。

(4) 明らかな耐性を示す BTSC に関して、薬剤耐性関連遺伝子、腫瘍関連遺伝子、幹細胞関連遺伝子等の発現解析を行い、その耐性機序の解明を図る。

3. 研究の方法

(1) ヒト glioma 細胞株を用いて、通常の培養条件ではなく、DMEM/F12 培地に EGF 及び FGF2 各成長因子を添加した sphere 細胞培養にて浮遊球状形態を示す neurosphere の形成を行うことで、細胞株由来の BTSC の樹立を試みる。

(2) 手術で摘出された悪性脳腫瘍、特に悪性 glioma の腫瘍標本から、初代培養細胞を作成し、培養された腫瘍細胞を用いて、上記培養条件で neurosphere 形成を図る。

(3) Self-renewal (自己再生)能に関して、上記培養で作成された neurosphere 細胞を継代培養し、sphere 培養が継続出来ることを確認する。また分化能に関しても培地を変え検討する。

(4) Nestin などの幹細胞としてマーカー発現を、免疫蛍光染色、immunoblot 等を使用し検証する。

(5) *In vitro* で確立された sphere 培養細胞を、ヌードマウスに移植し、腫瘍形成の有無を検討する。母体となった glioma 細胞株や初代培養細胞の親株とも形成率の比較を行う。

(6) BTSC としての形質が認められた幹細胞株を用いて、治療感受性実験を計画する。*in vitro* 培養条件下で、悪性神経膠腫治療に使用される TMZ などの抗腫瘍剤を培地に添加し、抗腫瘍効果につき MTT アッセイ、細胞数計測などにより検討する。同様に、その他の新規治療薬(細胞死誘導因子、シグナル伝達阻害剤等)に対する感受性の変化についても検討を重ねる。

(7) マウス腫瘍モデル(皮下・脳内)を用いて、*in vivo* での治療耐性の有無を検証する。

(8) 治療感受性に関与する可能性のある薬剤耐性関連遺伝子(TMZ 耐性の主因と考えられる *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)など)、細胞死関連遺伝子、腫瘍関連遺伝子等の BTSC での発現状態を immunoblot 法などを用いて検討し、各治療の効果とこれらの因子との関連性に

つき、比較検討する。

4. 研究成果

(1) 脳腫瘍幹細胞 (BTSC) の樹立。

脳腫瘍幹細胞 (BTSC) は治療抵抗性をもち、再発の主体となっているとの仮説が提唱されている。本研究において、我々の施設で手術にて摘出された悪性神経膠腫摘出標本から腫瘍細胞を分離し、BTSC の樹立を試みた。本報告書作成時点まで、40 症例で摘出標本から細胞培養を行い (膠芽腫 30 例 [うち再発膠芽腫 3 例を含む]、退形成性星細胞腫 2 例、退形成性乏突起膠腫 4 例、星細胞腫 1 例、乏突起膠腫 1 例、血管芽腫 1 例、髄膜腫 1 例)、うち 16 例の標本で培養が得られた (膠芽腫 14 例、退形成性乏突起膠腫 1 例、星細胞腫 1 例)。その中で、BTSC の条件の一つである培地内での sphere 形成が認められたのは 10 例であった (sphere 形成率= 25%)。そのうち、実験に使用が可能となる見込みの株は 4 種類であった。これらの細胞は、神経幹細胞に発現が認められる nestin が陽性であり、BTSC である可能性が示唆された。また、マウス脳内腫瘍モデルを作製し、その造腫瘍性についての検証を検討中である。

図 1. BTSC における sphere 形成

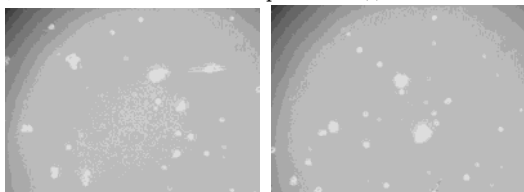
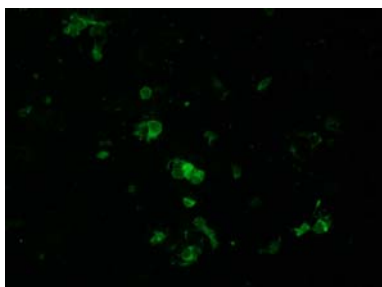
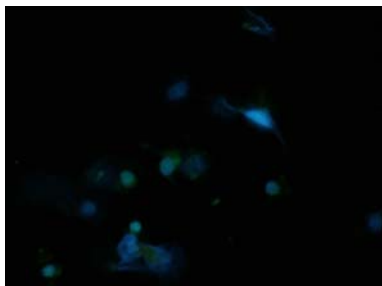


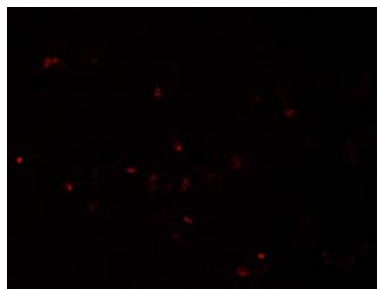
図 2. BTSC における分化マーカーの発現
Nestin



GFAP



04



さらに、共同研究を行っている岐阜大学副田先生から BTSC の X01S 株を供与頂き、マウス脳内移植により脳腫瘍を形成することを確認した。

(2) 薬剤感受性。

① X01S 細胞は、*in vitro* で膠芽腫に対する標準治療薬である TMZ 治療に強い耐性を示した。MTT アッセイにて、TMZ 200 μ M で増殖抑制率は 8%に過ぎなかった。一方、神経膠腫細胞株の U251 及び T98 は、同濃度で各 75.9%、41.1%の抑制率が認められた。

② 新規の分子標的治療の一つに、Death receptor を介する I 型アポトーシスを誘導する TRAIL/TRAIL 受容体系シグナル活性化を図る戦略があり、本研究室ではこれまで TRAIL-R2 (DR5) に対する agonistic monoclonal 抗体 (E11) による治療を研究してきた (Nagane M, et al. Predominant antitumor effects by fully human anti-TRAIL-receptor2 (DR5) monoclonal antibodies in human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. Neuro-Oncology 12: 687-700, 2010)、E11 治療に対し、感受性の高い T98 は 0.05 μ g/ml で 40%の細胞死誘導が認められたのに対し、X01S は 13%に留まり、アポトーシスに対しても耐性を示すことが示唆された。

(3) マウス脳腫瘍モデルにおける薬剤感受性。

in vivo のマウス脳腫瘍モデルにおいては、X01S 腫瘍に対する TMZ 治療により、マウスの生存期間が延長する結果が得られている。*in vitro* での耐性結果とはやや反する結果でもあり、その原因となる分子機構やその制御機構の解明が重要と考えられた。

(4) 薬剤感受性規定因子。

BTSC において、膠芽腫に対する標準治療薬である TMZ への治療反応性が一様でない結果が得られたことを受けて、TMZ 耐性の主因と考えられている DNA 修復酵素の MGMT status を検討した。X01S 細胞はプロモーター領域のメチル化陽性 (通常 TMZ 感受性を示唆する) であり、また本研究室で樹立した BTSC も 3 種中 2 種がメチル化陽性であった。しかも、

うち1例は摘出腫瘍標本では非メチル化 (TMZ 耐性を示唆) であり、むしろ BTSC の方が TMZ に対する感受性が MGMT の観点からは高い可能性もある結果が得られた。これらの結果から、BTSC における治療抵抗性は単純な経路で規定されている訳ではなく、複数のシグナル経路の制御が総合的に作用していることが示唆された。今後、これらの経路の異常の有無を検証していくことが必要である。

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)

[雑誌論文] (計10件)

- ① 小林啓一, 永根基雄、脳腫瘍の疫学と分類、J Clin Rehab 20: 154-157, 2011、査読無
- ② Nagane M, Kobayashi K, Tanaka M, Tsuchiya K, Shiokawa Y、Predictive value of mean apparent diffusion co-efficient value for responsiveness of temozolomide-refractory malignant glioma to bevacizumab、J Clin Oncol 29: suppl abstr e12517, 2011、査読有
- ③ 永根基雄, 小林啓一, 林基高, 佐藤研隆, 土屋一洋, 塩川芳昭、テモゾロミド不応性悪性神経膠腫に対するベバシツマブ単独療法の治療効果、脳外誌 19: 758-766, 2010、査読有

[学会発表] (計18件)

- ① 小林 啓一、田中雅樹、丸山啓介、野口明男、土屋一洋、永根基雄、塩川芳昭、術中ナビゲーションにおける T2 反転および錐体路・PET 画像融合の有用性、第 70 回日本脳神経外科学会総会、2011 年 10 月 13 日、横浜
- ② 小林 啓一、永根基雄、田中雅樹、塩川芳昭、中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する PAV 療法の使用経験、第 29 回日本脳腫瘍学会、2011 年 11 月 28 日、下呂、岐阜
- ③ Motoo Nagane, Keiichi Kobayashi, Masaki Tanaka, Kazuhiro Tsuchiya, Yoshiaki Shiokawa、Predictive value of mean apparent diffusion co-efficient value for responsiveness of temozolomide-refractory malignant glioma to bevacizumab、2011 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology、2011. 6. 4、Chicago, IL
- ④ Motoo Nagane, Keiichi Kobayashi, Masaki Tanaka, Kazuhiro Tsuchiya, Yukiko Shishido-Hara, Yoshiaki Shiokawa、Antiangiogenic therapy for recurrent malignant glioma by

bevacizumab monotherapy---Efficacy and future prospective---、29th Annual Meeting of Japan Society for Neuro-Oncology、2011. 11. 27、Gero, Gifu, Japan

- ⑤ 小林啓一他、悪性神経膠腫に対する化学療法によるリンパ球減少など血液毒性の評価と問題点、第 48 回癌治療学会、平成 22 年 10 月 28 日、京都
- ⑥ 小林啓一他、中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するステロイド及び HD-MTX 療法の治療効果の関連と予後解析、第 28 回日本脳腫瘍学会、平成 22 年 11 月 28 日、長野県軽井沢
- ⑦ Kobayashi, K, et al、Combination Therapy with Carboplatin and Etoposide for Recurrent Malignant Gliomas、The 3rd WFNO/ The 6th ASNO、July 14, 2009、Yokohama, Japan

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://mos-jp.com/kyorin-n/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 啓一 (KOBAYASHI KEIICHI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：70406990

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

永根 基雄 (NAGANE MOTOO)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：60327468

(4) 研究協力者

清水 早紀 (SHIMIZU SAKI)
杏林大学・医学部・実験助手
研究者番号：なし

原 由紀子 (HARA YUKIKO)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号：40313267