

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6月27日現在

機関番号：84414

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591888

研究課題名（和文） ヒト神経幹細胞をモデル細胞として応用したグリオーマ幹細胞標的薬の開発

研究課題名（英文） Development of new drugs for glioma stem cells in using human neural stem cells as in vitro model cells for drug screening and toxicity studies

研究代表者

金村 米博（KANEMURA YONEHIRO）

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター（臨床研究センター）・

先進医療研究開発部 再生医療研究室・室長

研究者番号：80344175

研究成果の概要（和文）：

本研究では悪性グリオーマに対する新薬の開発をめざし、正常神経幹細胞（NSCs）をモデル細胞に使用してグリオーマ幹細胞（GSCs）の薬剤感受性解析を実施した。手術標本から GSCs を樹立し、グリオーマ治療薬（ACNU, TMZ, INF- β , VCR, PCZ）およびその他の薬剤に対する感受性を NSCs と比較しながら検討した。その結果、両細胞は類似の薬剤感受性を示し、幾つかの化合物は両細胞に明らかな殺細胞効果を有することを明らかにした。これら成果は、GSCs の生物学的特性の理解を助け、GSCs を標的にした新薬開発に有用な情報をもたらすものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this research, to develop new drugs for malignant gliomas (MGs), we examined the in vitro chemosensitivity of glioma stem cells (GSCs) compared with normal neural stem cells (NSCs), which we used in vitro model cells for drug screening and toxicity studies. We isolated three GSC lines isolated from surgically removed MG tissues and examined their detailed in vitro cellular properties. In vitro chemosensitivity to drugs for MGs (ACNU, TMZ, INF- β , VCR, PCZ) or other compounds against GSCs and NSCs were examined. We found that both GSCs and NSCs showed similar chemosensitivities and several compounds showed significant cytotoxic effect to GSCs and NSCs equally. These findings will increase our knowledge about the cellular properties of GSCs and provide useful information for the development of new drugs that target GSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：脳腫瘍学、グリオーマ幹細胞

1. 研究開始当初の背景

・悪性グリオーマは最も代表的でかつ悪性度の高い脳腫瘍であるが、近年の放射線療法や化学療法の進歩によっても依然としてその予後は極めて不良であり、画期的な新薬開発が切望されている。

・悪性グリオーマ組織から、神経幹細胞 (neural stem cells: NSCs) と類似の特性を有するグリオーマ幹細胞 (glioma stem cells: GSCs) が同定・樹立され、腫瘍塊形成に中心的な役割を果たすが幹細胞であることが判明し、GSCsこそがグリオーマ治療薬開発の新しい標的であることが判明しつつある。

2. 研究の目的

正常ヒト NSCs と GSCs の薬物代謝特性を比較検討し、正常ヒト NSCs を使用する探索系から GSCs に殺細胞効果が期待される候補化合物を選択し、候補化合物の効果を GSCs で検証することで、高い選択性・感受性を有する新規 GSCs 標的薬開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 手術摘出標本からの GSCs の樹立とその特性解析

・ヒト NSCs の樹立・培養に最適化された培養方法を基本技術として使用し、手術摘出標本から GSCs を樹立する。

・樹立細胞に対して、①長期増殖能、②表面マーカー発現解析、③分化誘導能解析、④定量的 RT-PCR 法およびマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析、等の評価を各々実施し、*in vitro* での GSCs としての特性評価を行う。また免疫不全動物脳内へ移植を行い、腫瘍塊形成能の評価を *in vivo* で実施する。

(2) 正常ヒト NSCs および GSCs に細胞毒性を持つ候補化合物のスクリーニング

・正常ヒト NSCs をコントロール細胞として使用して、96 ウェルプレート、Microsphere array 等を使用して各種化合物が GSCs に及ぼす影響を解析する。

・GSCs に対する細胞増殖阻害濃度、細胞死誘発濃度、IC50 値を計測し、NSCs のデータと比較する。

・既存の各種ヒト株化腫瘍細胞に対する作用を評価し、候補化合物作用の GSCs に対する作用の選択性を評価する。

(3) 候補化合物の作用メカニズム解析

・NSCs および GSCs における候補化合物投与後の遺伝子発現変動をマイクロアレイを用いて包括的に探索する。その結果から、候補化合物作用に関連する遺伝子ネットワークを同定し、その作用メカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1) 手術摘出標本から樹立した GSCs の特性

解析

・Glioblastoma 手術摘出標本から neurosphere 法を使用して tumor-initiating cell の樹立を試み、*in vitro* で3か月以上 sphere 形態を維持して増殖可能な細胞株 (glioma derived cells: GDCs) を3クローン (GDC21, GDC36, GDC40) 樹立することに成功した (図1)。

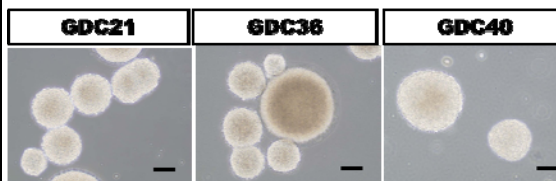


図1:新規樹立した GDCs
スケールバー: 100μm

・Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (アフィメトリクス社) を用いたコピー数変異 (CNV) 解析において、GDCs にはグリオーマで同定されている複数の CNV が存在することが確認された。

・NOD-scid マウスへの脳内移植実験において、3クローンの GDCs はいずれも腫瘍形成能を有することが確認され、GDCs は GSCs としての条件を満たす細胞であることを明らかにした。

・FACS を用いた解析において、GDCs と NSCs の間では細胞表面マーカーの発現様式に差異が認められ、特に ABC トランスポーターの発現様式に相違が確認された。

・マイクロアレイ解析において、NSCs と GDCs の比較において、4844 遺伝子に2倍以上の発現量の差がある事を明らかにすると同時に、各々の細胞にのみ選択的に発現する遺伝子群を同定した。

・レクチンアレイ解析において、GDCs は5種類のレクチンに高い親和性を有することを明らかにした。

(2) Microsphere array を用いたスクリーニング系の開発

・培養フラスコ内で維持培養されている NSCs を Microsphere array に播種し、アレイ上で均質なヒト neurosphere を作成するための培養条件の検討を実施した。その条件を用いて、増殖因子 (EGF) が NSCs の増殖に及ぼす効果の評価を Microsphere array 上に作成したヒト neurosphere 径の経時的変化率から推定する手法を開発した。

(3) NSCs および GDCs に細胞毒性を持つ候補化合物のスクリーニング

・GDCs (3ライン) と、対照細胞として NSCs (3ライン) およびグリオーマ株化細胞 (4ライン) を使用し、グリオーマ治療標準薬 (ACNU, TMZ, INF-β, VCR, PCZ)、その他の抗がん剤、さらに抗がん剤以外の用途で使用

される各種薬剤の作用を細胞増殖率評価（生細胞内 ATP 計測法）および細胞毒性評価（培養上清中 LDH 計測法）にて解析した。

・GDCs と NSCs は共通してグリオーマ治療標準薬に一定の抵抗性を示すことを明らかにした。一方、その他の抗がん剤および抗がん剤以外薬剤の一部に GDCs および NSCs のいずれに対しても細胞増殖抑制および細胞死を引き起こす作用を有する薬剤が存在することを見出した（図 2）。

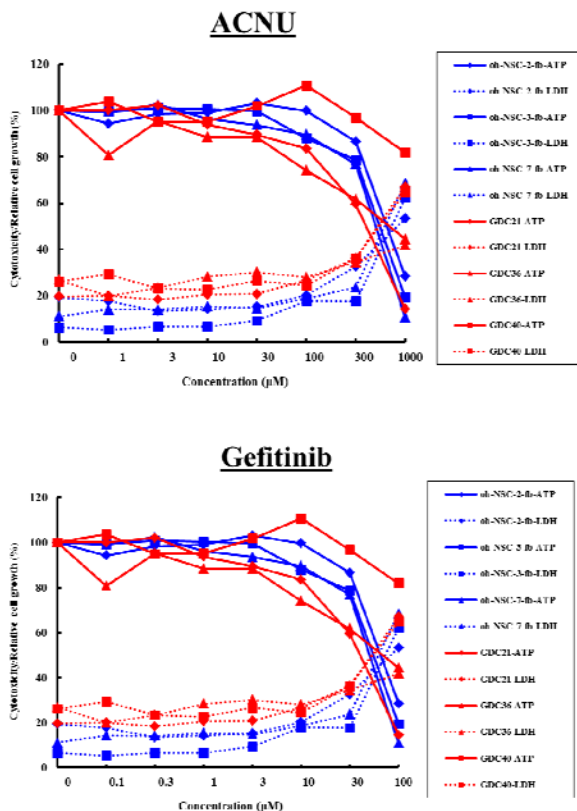


図 2：各種薬剤に対する GDCs および NSCs の反応性

ATP:細胞増殖率評価（生細胞内 ATP 計測法）、LDH:細胞毒性評価（培養上清中 LDH 計測法）

(4) 候補化合物の作用メカニズム解析

GDCs と NSCs の薬剤抵抗性のメカニズム解析として、マイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip)、MGMT 発現量解析、および MGMT プロモーターメチル化率を各々評価した。その結果、NSCs は MGMT プロモーターが低メチル化状態にあること、さらに GDCs と NSCs においては薬剤反応性関連遺伝子の発現に差異があ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 7 件）

- ① Irie Y, Saeki M, Tanaka H, Kanemura Y, Otake S, Ozono Y, Nagai T, Kondo Y, Kudo K, Kamisaki Y, Miki N, Taira E: Methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells. Cell Tissue Res 345(2):231-241, 2011 査読有 DOI: 10.1007/s00441-011-1207-5
- ② 金村米博：中枢神経疾患に対する細胞移植療法を用いた再生治療．脳神経外科 39(1):5-23, 2011 査読無 <http://www.bitway.ne.jp/ejournal/club/1436101316.html>
- ③ 高原将司, 金村米博, 豊田美江, 前川隆司, 森内秀祐：自己腫瘍ライセートをエレクトロボレーション法で取り込ませた樹状細胞は IFN- γ 産生細胞の誘導を高める．Biotherapy 24(1):21-26, 2010 査読有 <http://www.pieronline.jp/content/article/0914-2223/24010/21>
- ④ 金村米博：神経幹細胞樹立に使用可能な細胞ソースと細胞品質管理．実験医学増刊 28(2):75-82, 2010 査読無 <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ai4jigkb/2010/002802/009&name=0209-0216j&UserID=222.146.248.248>
- ⑤ Kanemura Y: Development of cell-processing systems for human stem cells (neural stem cells, mesenchymal stem cells, and iPS cells) for regenerative medicine. Keio J Med 59(2):35-45, 2010 査読有 <http://www.kjm.keio.ac.jp/past/59/2/index.html>
- ⑥ 金村米博, 森 英樹, 八尋寛司, 中澤浩二：細胞凝集塊形成プロセス制御による幹細胞の培養・分化制御．再生医療 9(3):47-52, 2010 査読無 <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ai1regeb/2010/000903/008&name=0343-0348j&UserID=222.146.248.248>

〔学会発表〕（計 19 件）

- ① 金村米博：ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を応用した薬物安全性評価システムの開発（ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築）．スーパー特区フォーラム in 大阪, 2012.1.19；豊中市
- ② 金村米博：悪性グリオーマの分子診断体制と細胞免疫治療法の開発．文部科学省

- 橋渡し研究支援推進プログラム・橋渡し研究ネットワーク構築事業シンポジウム 西日本のトランスレーショナルリサーチ ネットワーキングで活性化―“ACT West”基盤整備とプロジェクト展開, 2012.1.16; 吹田市
- ③ Kanemura Y: iPS in neurooncology. Taipei VGH and NYMU Brain Tumor Symposium 2011, 2011.11.30; Taipei, Taiwan
- ④ 金村米博, 正札智子, 兼松大介, 松本有佳子, 山本篤世, 埜中正博, 森内秀祐, 中島 伸, 末水洋志, 中村雅登, 岡田洋平, 岡野栄之, 山崎麻美: ヒト iPS 細胞を応用したヒトグリオーマ幹細胞の薬剤感受性評価. 第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2011.11.27; 岐阜県下呂市
- ⑤ Kanemura Y, Shofuda T, Kanematsu D, Matsumoto Y, Yamamoto A, Nonaka M, Moriuchi S, Nakajima S, Suemizu H, Nakamura M, Okada Y, Okano H, Yamasaki M: In vitro chemosensitivity of human glioma stem cells compared with that of normal neural stem cells from human iPS cells. 2011 SNO 16th Annual Scientific Meeting, 2011.11.17-20; Orange County, California, USA
- ⑥ 金村米博: ヒト iPS 細胞の実用化を支援する周辺技術開発. 次世代医療システム産業化フォーラム, 2011.5.25; 大阪市
- ⑦ 金村米博: 神経幹細胞樹立に使用可能な細胞ソースと細胞品質管理および創薬研究への応用. 第 10 回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー「培養細胞を利用した創薬研究―ここまで進んだバリデーション―」, 2011.1.28; 豊中市
- ⑧ 金村米博: ヒトグリオーマ幹細胞の細胞特性解析と薬剤感受性評価. 第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2010.11.28; 長野県北佐久郡軽井沢町
- ⑨ 金村米博, 正札智子, 岡田洋平, 岡野栄之, 山崎麻美: ヒト神経幹細胞の細胞特性解析とその品質管理指標. 社団法人日本脳神経外科学会第 69 回学術集会, 2010.10.28; 福岡市
- ⑩ Kanemura Y: Stem cell research of congenital central nervous system malformations in pediatric neurosurgery. International Symposium on Fetal Neurology, 2010.10.24, Osaka, Japan
- ⑪ Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Goto S, Peshwa MV, Kanemura Y, Maekawa R, Moriuchi S: Dendritic cells loaded with autologous tumor lysate by electroporation effectively induce lysate specific IFN- γ producing T cells in glioblastoma patients. AACR 101st Annual Meeting 2010, 2010.4.20; Washington, DC, USA
- ⑫ 金村米博: ヒトニューロスフェアの細胞特性とその品質管理指標. 第 9 回日本再生医療学会総会, 2010.3.18; 広島市
- ⑬ Kanemura Y: Stem cell research of congenital central nervous system abnormalities in pediatric neurosurgery. Neurosurgery Update 2010 “Induced pluripotent stem cells”, Seoul National University College of Medicine, 2010.3.6; Seoul, Korea
- ⑭ Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Goto S, Kanemura Y, Maekawa R, Moriuchi S: 悪性グリオーマ由来腫瘍ライセートをエレクトロポレーション法で導入した樹状細胞は抗原特異的 IFN γ 産生細胞の誘導を高める. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009.12.4; 大阪市
- 〔図書〕(計 1 件)
- ① 金村米博: 悪性グリオーマに対する樹状細胞ワクチン療法の臨床研究について. 免疫細胞治療 II (安元公正監修): 82-83, 幻冬舎メディアコンサルティング, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金村 米博 (KANEMURA YONEHIRO)
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター (臨床研究センター)・先進医療研究開発部 再生医療研究室・室長
研究者番号: 80344175

(2) 研究分担者

正札 智子 (SHOFUDA TOMOKO)
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター (臨床研究センター)・先進医療研究開発部 幹細胞医療研究室・室長
研究者番号: 40450895

(3) 連携研究者

森内 秀祐 (MORIUCHI SHUSUKE)
りんくう総合医療センター・脳神経外科・部長
研究者番号: 90322180
内藤 猛章 (NAITO TAKEAKI)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 00068339
宮田 興子 (MIYATA OKIKO)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90102110
有田 憲生 (ARITA NORIO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80159508