

機関番号：24403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710062

研究課題名（和文） 脳腫瘍がん幹細胞モデル細胞による放射線抵抗性獲得機構の解明

研究課題名（英文） The radioresistance mechanism by neurosphere as a cancer stem cell model cell

研究代表者

白石一乗（SHIRAISHI KAZUNORI）

大阪府立大学・産学官連携機構・助教

研究者番号：40347513

研究成果の概要（和文）：

【緒言】本研究では正常神経幹細胞を実験的にがん化させることを目的として、マウス神経幹細胞を含むニューロスフェア形成細胞を長期間培養し、不死化させることを試みた。

【結果】ニューロスフェア形成細胞を3日毎に継代した場合も徐々に増殖能力が低下し、17～30回（平均22.9回）分裂した後に増殖が停止した。一方、10日毎に継代した場合、8継代を超えたあたりから、一定以上の増殖率を保つようになった。現在、分裂回数は100回を越えており不死化したものと思われる。この不死化細胞の染色体解析の結果、多くの細胞で核型の不安定化が見られたが一部の細胞では正常2倍体を保っていた。また、コロニーアッセイ法によって放射線感受性を求めたところ、ニューロスフェア形成細胞は繊維芽細胞に比べて、僅かに感受性であった。しかしながら、これまで報告にあったCD133陽性ニューロスフェア形成細胞における放射線抵抗性の充進は認められなかった。また、これらの放射線修復動態を調べた結果、ニューロスフェア形成細胞で早期の修復応答が確認された。これらの結果から、ニューロスフェア形成細胞に含まれる神経幹細胞の放射線応答は分化した細胞とは異なることが示唆された。このことは放射線発がん過程を理解する過程での幹細胞の役割を知る上で、重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate that neural stem cells result in cancer stem cell during tumorigenesis, in this study, it is tried that whether the neurosphere (containing neural stem cell) transform to malignants relevant to tumorigenesis in vivo. When it cultured per 10 days, it came to maintain the growth ratio more. It seems that the number of divisions is over 100 times, and then formed into immortal cells. As a result of the chromosome analysis of this immortal cells, although the instability of the karyotype was mainly seen in cells, in some cells, the karyotype was maintained normal twice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			

年度			
年度			
総計	3, 500, 000	1, 050, 000	4, 550, 000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：神経幹細胞、不死化、放射線抵抗性

1. 研究開始当初の背景

1980年代までは、哺乳動物中枢神経系細胞においては、生後再生能力はないと考えられてきた。しかし、1990年代初頭に、マウス成体脳の側脳室上衣下層（subventricular zone; SVZ）から増殖能と多分化能を併せ持ついわゆる神経幹細胞が分離され、neurosphereとしてクローン化して培養する方法が確立された（Reynolds and Weiss, Science, 255, 1992）。Neurosphereを形成した細胞は、培養系において培地に依存してニューロン、星状細胞、及び乏突起グリア細胞に分化し得ることが明らかになっている。さらに、最近になって、がんの起源として「がん幹細胞」という概念がクローズアップされるようになってきた。したがって、脳腫瘍の発生と増殖にも脳腫瘍幹細胞（brain tumor stem cells）が関わっていることを示す証拠が次第に集まりつつある（Vescovi AL, et al, Nat Rev Cancer, 6, 2006）。神経膠芽細胞腫は、致死性の高い脳腫瘍の一つであり、患者の平均生存期間は12ヶ月以下である。神経膠芽細胞腫が難治性を示す理由は、放射線、及びその他の化学療法に抵抗性であるからである。なぜ放射線抵抗性を示すのかは不明であったが、最近になって、神経膠芽細胞腫の中のがん幹細胞の特徴（CD133+）を持つ腫瘍細胞群が存在し、それらの腫瘍細胞が、DNA損傷チェックポイント応答の活性化能が高く、また、DNA損傷修復能も高いためにアポ

トーシスに対して抵抗性を示すからであるという成果が報告された（Bao, S et al, Nature, 444, 2006; Piccirillo, SGM et al, Nature, 444, 2006）。この理由を解明するには、適切な実験マウスモデルが必要であるが、マウス由来神経膠芽細胞腫は存在しないので、マウス細胞を用いて、神経幹細胞とがん幹細胞の相違を検討できないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、神経膠芽細胞腫（glioblastoma）における放射線抵抗性の原因が、腫瘍細胞中に存在するがん幹細胞の性質に由来することを明らかにすることが目的である。最近、ヒト神経膠芽細胞腫では、腫瘍細胞中のがん幹細胞が存在し、このがん幹細胞が高いDNA修復能とDNA損傷応答能を持つために放射線抵抗性を示すことが報告された。神経膠芽細胞腫の治療成績を格段に向上させるためには、なぜがん幹細胞が高いDNA修復能とDNA損傷応答能を持つのかを明らかにする必要がある。そのためには、適切な実験マウスモデルが望まれる。しかし、正常神経幹細胞はマウス脳組織より分離して培養可能であるが、マウスの神経膠芽細胞腫が存在しないので、正常神経幹細胞とがん幹細胞を比較して調べることは、マウスでは不可能であり、ヒト細胞に頼らざるを得ない。一方、ヒト神経膠芽細胞腫は入手可能であるが、ヒト正常神経幹細胞の入手は困難である。そこで本研究

では、マウス正常神経幹細胞を出発材料として、これにヒトテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子導入とX線照射を組み合わせ、in vitro でマウス脳腫瘍細胞を作成する。このがん細胞と正常神経幹細胞の DNA 損傷応答能、DNA 修復能、及びアポトーシス感受性などを比較することによって、神経膠芽細胞腫形成と放射線抵抗性獲得におけるがん幹細胞の役割の実態を明らかにし、がんの放射線療法への応用に資する基礎データを提供する。

3. 研究の方法

神経幹細胞とがん幹細胞の放射線応答に関する類似点と相違点を明らかにし、神経膠芽細胞腫中の CD133+細胞がなぜ DNA 修復能と DNA 損傷チェックポイント能が活性化しているのかの謎に迫る。

(1) 放射線感受性試験

- ①細胞にX線照射装置を用いてX線を照射し、直ちに0.8%メチルセルロース培地中に播種して、コロニー形成させる。
- ②3週間後、形成されたコロニーを計測して、生存率曲線を作成し、D0値を求める。ICRマウス胎児由来線維芽細胞を対照群として、同様にD0値を求め、正常神経幹細胞、及びがん化神経幹細胞と比較する。
- ③得られた結果から、p53遺伝子の有無による感受性変化を解析する。

(2) 染色体異常試験

- ①神経幹細胞及びがん細胞中のがん幹細胞 (CD133+細胞) のDNA修復能を定量化するために、放射線照射後の染色体異常を計測する。細胞にX線を照射後、すぐにコルセミドを培地に添加し、2時間培養後に染色体標本作製する。
- ②顕微鏡下で、染色分体型異常 (切断及び交換) を定量化し、線維芽細胞と比較する。

③得られた結果から、p53遺伝子の有無による感受性変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 放射線感受性試験

マウス胎児線維芽細胞に比べて神経幹細胞は僅かに抵抗性を示した。一方で、これまでに報告のあったCD133陽性細胞における放射線抵抗性は認められなかった。さらに、DNA修復動態をヒストン γ -H2AXを指標にして調べた結果、神経幹細胞は線維芽細胞に比べて、照射後の修復応答が早いことが示された。これにより、神経幹細胞と分化細胞では修復応答が異なる可能性が示唆された。

(2) 染色体異常試験

線維芽細胞を3日毎に継代した場合は、約13回分裂した後に増殖が停止し、老化マーカーである酸性 β -ガラクトシダーゼの発現が見られた。一方、ニューロスフェア形成細胞を3日毎に継代した場合も徐々に増殖能力が低下し、17~30回 (平均22.9回) 分裂した後に増殖が停止した。また、マウス胎児線維芽細胞と同様に、増殖が停止した細胞では酸性 β -ガラクトシダーゼの発現がみられた。これに対して、マウス胎児線維芽細胞を10日毎に継代した場合は、6継代を超えたあたりから長期に渡って高い増殖能力を保つようになった。また、ニューロスフェア形成細胞では、10日毎に継代した場合、8継代を超えたあたりから、一定以上の増殖率を保つようになった。長期の増殖性を持つ線維芽細胞の染色体数は全て3~4倍体となり、染色体の不安定性を示した。一方、ニューロスフェア形成細胞では約50%の集団で2倍体を維持しており、比較的安定であった。このように、両者の細胞では染色体安定性の保持機構に大きな違いがあることを示す結果となった。

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)

[学会発表] (計6件)

①東田みずき、マウスニューロスフェア形成細胞を用いた選択的染色体分配の検証、日本放射線影響学会、2009年11月11日、広島市

②白石一乗、hTERT遺伝子を導入したマウス不死化神経幹細胞の放射線感受性、日本放射線影響学会、2009年11月11日、広島市

③児玉靖司、白石一乗、マウス神経幹細胞における選択的染色体分配、日本癌学会、2010年9月22日、大阪市

④寺本敬志、白石一乗、原正之、児玉靖司、マウス神経幹細胞における放射線損傷応答の解析、日本放射線影響学会、2010年10月20日、京都市

⑤今西香絵、白石一乗、児玉靖司、マウスニューロスフェア形成細胞を用いた不死化の試み、日本放射線影響学会、2010年10月20日、京都市

⑥田辺正輝、白石一乗、縄田寿克、押村光雄、児玉靖司、放射線誘発染色体不安定性と染色体内再構成との関係日本放射線影響学会、2010年10月20日、京都市、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石一乗 (SHIRAIISHI KAZUNORI)

大阪府立大学・産学官連携機構・助教

研究者番号：40347513