

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22249055

研究課題名(和文) グリオブラストーマ癌幹細胞モデルを用いた薬剤抵抗性及び浸潤性克服戦略の開発

研究課題名(英文) Development of new strategies to overcome glioblastoma invasiveness and drug-resistance using a glioma stem cell model

研究代表者

佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80264282

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマの強い浸潤能と悪性度を規定する分子シグナルを同定し、それらに基づく新たな治療戦略を構築することを目的として研究を行った。具体的には：(1) 腫瘍細胞が正常脳内に浸潤する様子を可視化するアッセイを確立し、浸潤パターンを検証した。(2) 浸潤能が高い腫瘍細胞は間葉系の性質が強く、その抑制が浸潤能を有意に軽減させることを証明し、候補薬剤を取得した。また、腫瘍細胞が正常血管の内皮細胞を巻き込みながら浸潤を続けている現象を見出し、その現象を評価するアッセイを構築した。(3) 現行治療の一環である反復放射線照射に対する抵抗性が獲得される過程を解析し、主要な規定因子の一つを同定した。

研究成果の概要(英文)：

The goal of this study was to identify the molecular basis of the high invasiveness and aggressiveness of malignant gliomas in order to develop novel therapeutic strategies. Using our syngeneic murine model of glioblastoma, we (1) established an assay for the real-time monitoring of glioma cell invasion into the normal brain and identified the main invasion patterns; (2) showed that inhibition of mesenchymal characteristics of glioma cells effectively reduces invasion and identified potential targeting agents. Furthermore, we uncovered the co-option of endothelial cells by tumor cells and the formation of invasion complexes and established assays for their analysis and (3) analyzed the mechanism of acquired radioresistance during repeated radiation and identified one of its key regulators.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2010年度 | 15,900,000 | 4,770,000 | 20,670,000 |
| 2011年度 | 10,500,000 | 3,150,000 | 13,650,000 |
| 2012年度 | 10,500,000 | 3,150,000 | 13,650,000 |
| 総計 | 36,900,000 | 11,070,000 | 47,970,000 |

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細胞・組織 ②癌 ③発生・分化 ④遺伝子 ⑤バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマは集学的治療を施行しても高率に再発するため、5年生存率は未治療の症例と変わらない。その原因として、治療時に既に手術・照射療法の範囲外に腫瘍細胞が存在することが考えられる。つまり、原発巣から正常脳内に遊走した、高い運動能・浸潤能を持ち、抗癌剤に感受性の低いグリオーマ細胞は依然として治療のターゲットとして残されている。申請者らは過去に行った研究により、抗浸潤療法を成功させるには確かな標的分子の解明だけでなく、標的とすべき細胞の正確な同定、薬剤投与時期の正しい選択、殺細胞効果のある治療法との組み合わせ、治療抵抗性の克服など多面的なアプローチが必須であると考え、上記のすべてが詳細に解析・評価可能であるヒトのグリオブラストーマに類似した動物モデルの確立に成功した。そのモデルを利用して、*in vivo* でグリオブラストーマの浸潤性及び治療抵抗性のメカニズムを解析し、有効な低分子化合物の探索を行うべき時期に来ていた。

2. 研究の目的

悪性グリオーマの強い浸潤能と悪性度を規定する分子シグナルを同定し、それらに基づく新たな治療戦略を構築することを目的として研究を行った。具体的には：

- (1) **腫瘍形成過程における浸潤の解析**：腫瘍形成過程においてどの細胞がどの時期にどのような浸潤パターンを呈するかを同定する。さらに、脳腫瘍の従来の微小環境である正常脳を生体外で維持しながら腫瘍細胞の浸潤が可視化・追跡できるアッセイを確立し、同定した浸潤パターンの解析を行う。
- (2) **浸潤パターン別の詳細解析及び標的薬剤の探索**：確認された浸潤パターン別にその規定因子を同定し、分子標的薬剤を探索する。

- (3) **治療抵抗性の規定因子の解析及び克服法の考案**：現行治療に抵抗性を示すと報告されている腫瘍幹細胞が治療中に起こす変化を解析し、抵抗性規定因子を同定し、抵抗性を克服する戦略を考案する。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍形成過程における浸潤の解析

マウスに腫瘍を移植し、1週間ごとに腫瘍の大きさと浸潤形式を検証し、腫瘍形成過程における浸潤を経時的に解析した。次に、その結果同定した浸潤パターンが生体に近い状況でリアルタイムにモニタリングできるアッセイ系（脳スライス培養）を確立した。そのアッセイを用いて複数種類の腫瘍細胞の浸潤能の評価を行った。

(2) 浸潤パターン別の詳細解析及び標的薬剤の探索

浸潤能が高い細胞及び低い細胞の遺伝子プロファイルと比較し、浸潤促進因子の候補の探索を行った。また、培養脳切片で腫瘍細胞の浸潤をリアルタイムで追跡し、浸潤形式より細胞の性質の解析を行った。さらに、上記より絞り込んだ因子を標的とした薬剤の抗浸潤効果を同様のアッセイで評価した。

(3) 治療抵抗性の規定因子の解析及び克服法の考案

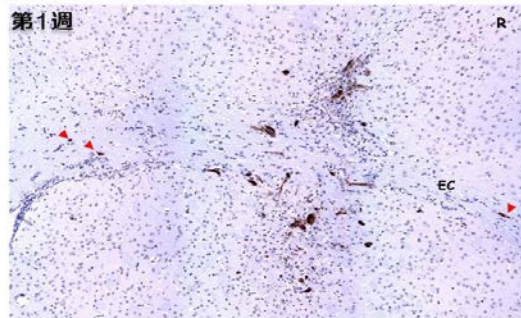
幹細胞性質の強い細胞の中から反復放射線照射後に生存する腫瘍細胞群を樹立し、放射線治療に対する反応性、分化度、遺伝子プロファイル、分泌するサイトカインなどを調べ、治療中のフェノタイプの変化を評価した。その結果浮かび上がった抵抗性規定因子に対する阻害剤を使用し、マウスモデルでその効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍形成過程における浸潤の解析

悪性グリオーマ細胞の正常脳への浸潤が腫瘍塊形成に先行して始まり、複数の形態を呈しながら増悪することを見出した。腫瘍細胞の浸潤が腫瘍形成の初期より①血管に沿った浸潤と②神経線維に沿った浸潤に分かれることを明らかにし、浸潤を腫瘍塊形成早期から、また、パターン別にターゲティングする必要があることを報告した（図1、Sampetean et al., *Neoplasia*, 2011 より改変）。

腫瘍塊形成前に始まる神経線維に沿った浸潤



経時的に増強する血管に沿った浸潤



図1：腫瘍形成過程における浸潤パターンの解析

さらに、正常脳という脳腫瘍の微小環境を生体外で維持しながら浸潤パターンを可視化・評価するアッセイ系を確立した（図2、一部 Sampetean et al., *Neoplasia*, 2011 より改変）。

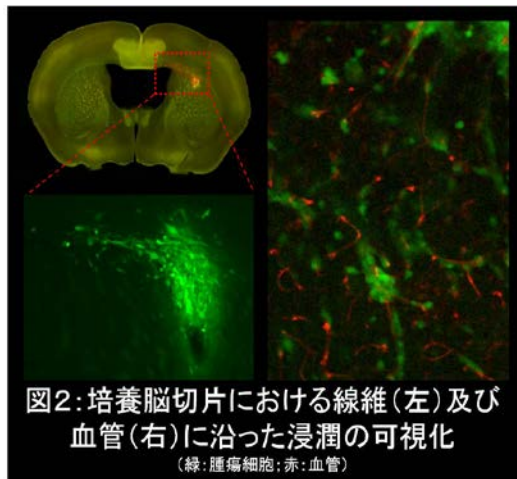


図2：培養脳切片における線維(左)及び血管(右)に沿った浸潤の可視化

(緑:腫瘍細胞;赤:血管)

(2) 浸潤パターン別の詳細解析及び標的薬剤の探索

① 神経線維に沿った浸潤：培養脳切片における腫瘍細胞の追跡より、グリオブラストーマ細胞がシングル・セルとして遊走する場合と集団として遊走する場合があることを見出した。シングル・セルとして遊走できる細胞は間葉系の性質が強く、上皮間葉転換阻害剤がその浸潤能を抑制することを証明した。その浸潤抑制効果は *in vitro* だけでなく、培養脳切片を用いた半生体のアッセイ系でも確認された（図3）。現在、最大の効果が得られる薬剤の選定を行っている。

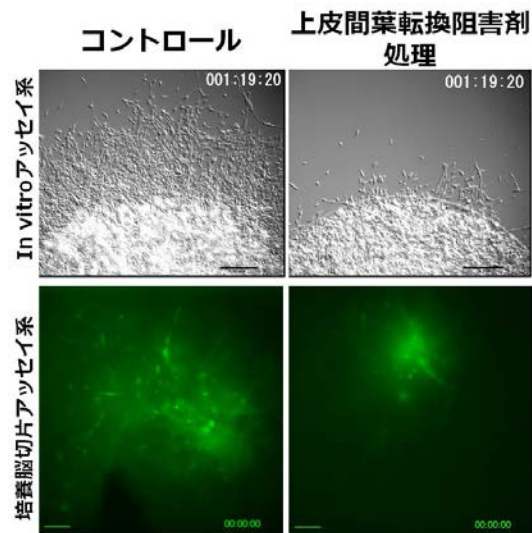
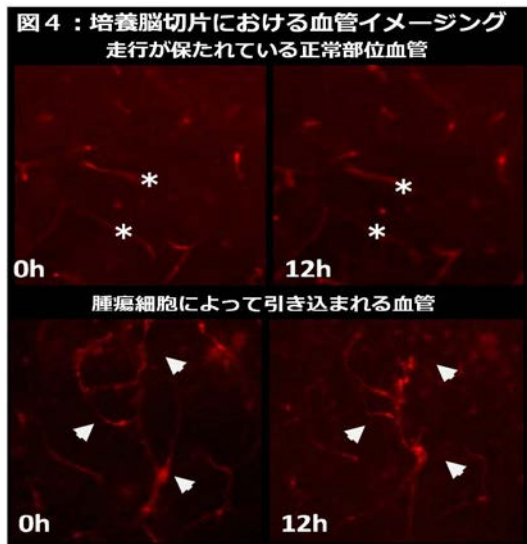


図3：浸潤規定因子の解析及び薬剤効果の評価

② 血管に沿った浸潤：培養脳切片を用いて腫瘍細胞が正常脳に浸潤する様子をタイムラプス顕微鏡で追跡した結果、腫瘍細胞が血管に沿って移動するだけでなく、血管内皮細胞を既存の血管から引き込み、浸潤複合体を形成し、遊走を続ける現象を記録した（図4）。



さらに腫瘍細胞・血管内皮細胞からなる浸潤複合体を *in vitro* の3次元培養で再現することに成功した。

現在、複合体形成時の構成細胞の分子解析を進めており、その形成を引き起こす主要な規定因子の同定を目指している。腫瘍細胞と血管内皮細胞の相互作用を解明することによって、抗浸潤療法だけでなく、グリオブラストーマ治療において大きな課題となっている血管新生の制御も可能になると期待される。

(3) 治療抵抗性の規定因子の解析及び克服法の考案

治療範囲外（正常脳）に浸潤した細胞だけではなく、治療範囲内（腫瘍塊）に存在し、強い治療抵抗性を示す腫瘍幹細胞にも注目し、治療中の抵抗性獲得メカニズムを検証した。その際、悪性グリオーマに対する現行治療の一環であり、さらに当モデルの細胞において大きな反応性の差異が認められた放射線療法に注目した。解析の結果、反復した照射によって腫瘍幹細胞が段階的に性質を変え、放射線に対し新規抵抗性を獲得することを証明した。そして、その分子メカニズムが IGF1 シグナル伝達経路によって制御されており、IGF1 経路の阻害が放射線治療の効果を増強

させることを見出した（図5、Osuka et al., *Stem Cells*, 2013 より改変）。

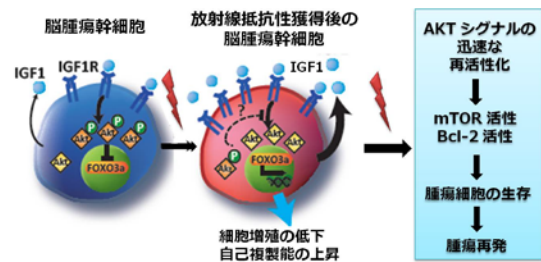


図5：反復放射線照射に対する抵抗性獲得のメカニズム

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 Sampetean O and Saya H: Characteristics of glioma stem cells. *Brain Tumor Pathol* 2013, 査読あり (in press)
- ② Osuka S, Sampetean O (11人中2番目), Saya H et al., (11人中11番目) : IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 31: 627-640, 2013, 査読あり
- ③ Muto J, Saya H (13人中10番目) et al.: RNA-Binding Protein Musashi1 Modulates Glioma Cell Growth through the Post-Transcriptional Regulation of Notch and PI(3) Kinase/Akt Signaling Pathways. *PLoS One* 7:e33431, 2012, 査読あり
- ④ Sampetean O (12人中1番目), Saya H (12人中12番目) et al.: Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia* 13:784-791, 2011, 査読あり
- ⑤ Tabuse M, Saya H (14人中8番目) et al.: Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer stem cells. *Mol Cancer* 10:60. doi:

- 10.1186/1476-4598-10-60、2011、査読あり
- ⑥ Ishimoto T, Saya H (21人中21番目) et al.: CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc- and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*, 19:387-400, 2011, 査読あり
- ⑦ Ishizawa J, Saya H (14人中14番目) et al.: The cell cycle regulator Cdh1 controls the pool sizes of hematopoietic stem cells and mature lineage progenitors by protecting from genotoxic stress. *Cancer Sci* 102:967-974, 2011, 査読あり
- ⑧ Muraguchi T, Saya H (16人中14番目) et al.: NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells. *Cancer Res* 71:1135-1145, 2010, 査読あり
- ⑨ Lee SH, Saya H (3人中3番目) et al.: Mad2 targets the mitotic kinesin MKlp2 and inhibits its kinesin function required for cytokinesis. *J Cell Biol* 191:1069-1077, 2010, 査読あり
- ⑩ Shinoe T, Saya H (6人中3番目) et al.: Identification of CD44 as a cell surface marker for Müller glia precursor cells. *J Neurochem* 115:1633-1642, 2010, 査読あり
- ⑪ Shimizu T, Saya H (21人中21番目) et al.: c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene* 29:5687-5699, 2010 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

- ① Saya H: Invasive and radio-resistant characteristics of glioma stem cells. 10th Asian Society for NeuroOncology (ASNO)

- conference, 03/22/2013, Mumbai, India
- ② Saya H: Characterization of brain tumor stem cells using induced cancer stem cell (iCSC) technology. Invited Lecture, Korean Neuro-Oncology Meeting. 9/22/2012, Gyeonggi-do, Korea
- ③ Sampetean O: Anti-invasion strategies in an induced cancer stem cell model of glioblastoma, 19th International Brain Tumor Research and Therapy Conference, 6/23/2012, Niagara Falls, Canada
- ④ Sampetean O: Invasion characteristics of tumor cells in a glioblastoma model of genetically modified neural stem cells, 103 Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 4/3/2012, Chicago, USA
- ⑤ Sampetean O: New strategies in glioblastoma treatment - insights from the induced cancer stem cell (iCSC) model, Taipei VGH and NYMU Brain Tumor Symposium 2011, 11/30/2011, Taipei, Taiwan
- ⑥ サンペトラ オルテア: 悪性脳腫瘍幹細胞の浸潤能の解析。第 29 回日本脳腫瘍学会。11/27/2011。岐阜県下呂市
- ⑦ サンペトラ オルテア: グリオーマ幹細胞モデルを用いた薬剤抵抗性克服。第 70 回日本癌学会学術総会。10/3/2011。名古屋国際会議場、名古屋
- ⑧ Sampetean O: 誘導癌幹細胞脳腫瘍モデルにおける腫瘍塊形成前の浸潤様式の解析。第 69 回日本癌学会学術総会。9/24/2010。大阪国際会議場
- ⑨ Sampetean O: Analysis of invasion patterns in a model of malignant brain tumor, The 18th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy,

5/16/2010, Travemunde, Germany

⑩ Sampetrian Q: Analysis of invasion patterns in an induced cancer stem cell model of malignant brain tumor, AACR 101 Annual Meeting, 4/18/2010, Washington, DC, USA

⑪ Saya H: Role of CD44 hyaluronan receptor in cancer stem cells. 8th International Conference on Hyaluronan. The International Society for Hyaluronan Sciences (ISHAS), 6/9/2010, Kyoto

⑫ 佐谷秀行: 誘導型がん幹細胞の解析と応用。第 51 回日本臨床細胞学会総会。5/31/2010。パシフィコ横浜

[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://genereg.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：80264282

(2) 研究分担者

サンペトラ オルテア
(SAMPETREAN OLTEA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50571113

(3) 連携研究者
該当なし