

## 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 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590357

研究課題名（和文） 間葉系細胞の性格を持つ cancer stem-like cells と血管性ニッチ

研究課題名（英文） Cancer stem-like cells with the characteristics of mesenchymal cells and the vascular niche.

研究代表者 岩下寿秀（TOSHIHIDE IWASHITA）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00283432

研究成果の概要（和文）：ヌードマウス皮下移植モデルにおいて、nestin 陽性グリオーマ細胞が血管中心性に増生し、非 nestin 陽性グリオーマ細胞は nestin 陽性グリオーマ細胞の周囲において増生することを示した。それら細胞を FACS にて採取することに成功した。遺伝子プロファイルを行うと、nestin 陽性細胞には間葉系マーカーが強く発現されていた。そこで、TGFbeta 存在下で培養すると、筋線維芽細胞や骨芽細胞へ分化した。さらに、nestin 陽性グリオーマ細胞は抗がん剤に耐性であることが証明された。以上のことから、nestin 陽性グリオーマ細胞はより未分化な細胞集団と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We found that the nestin-negative glioma cells were grown around the nestin-positive glioma cells growing in perivascular in the subcutaneous tumors grown as xenografts in nude mice. By using FACS, these two populations were successfully harvested. Global gene expression profiles demonstrated that some mesenchymal markers were up-regulated in the nestin-positive glioma cells. In the presence of TGF-beta, nestin-positive glioma cells differentiated into myofibroblasts and osteoblasts. We also found that nestin-positive glioma cells were more resistant to anti-cancer reagents compared with nestin-negative glioma cells. Taken together, nestin-positive glioma cells were considered to be more undifferentiated than nestin-negative glioma cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：幹細胞 間葉系 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

Clarke 教授（Stanford 大学）のグループ

は、幹細胞生物学の概念をいち早く腫瘍生物学に取り入れ、細胞表面蛋白に対する抗体を用いた FACS(Fluorescence activated cell sorting)を活用して、ヒトの乳癌組織中の CD44 陽性 /CD24 陰性細胞のみが tumorigenicity を有することを証明し、CD44 陽性/CD24 陰性細胞を乳癌がん幹細胞と呼ぶことを提唱した。つまり、腫瘍組織の一部の細胞のみが tumorigenicity を有し、他の細胞は tumorigenicity を有さないか低いものと考えた。Cancer stem-like cells の存在については依然議論が多く、依然仮説に留まっている状態である。我々は、C6 グリオーマ細胞を用いて、cancer stem-like cells の存在とそのニッチに関する実験を行った。

## 2. 研究の目的

### ①Nestin 陽性 C6 グリオーマ細胞の分離と遺伝子 profile

皮下に移植して増大した C6 グリオーマを nestin (神経幹細胞マーカー) によって、染色すると血管を中心にして (血管性ニッチ)、nestin 陽性腫瘍細胞が増生しているのを見出した。Nestin 陽性細胞と nestin 陰性腫瘍細胞とを細胞生物学的に比較する。

### ②血管性ニッチを構成する pericyte の分離と遺伝子 profile

血管性ニッチを構成する pericyte を分離して、生理学的な解析を行う。

## 3. 研究の方法

①Nestin 陽性 C6 グリオーマ細胞の分離  
Nestin 陽性腫瘍細胞特異的な細胞表面マーカーを見出し、nestin 陽性腫瘍細胞と非 nestin 陽性腫瘍細胞を FACS によって分離する。

②血管性ニッチを構成する pericyte の分離  
Pericyte と動脈壁平滑筋細胞特異的に発現する NG2 (chondroitin sulfate proteoglycan) の promotor によって Ds-Red が発現するトランスジェニックマウスの肺から NG2 Ds-Red 陽性/lineage marker 陰性の pericyte を分離する。

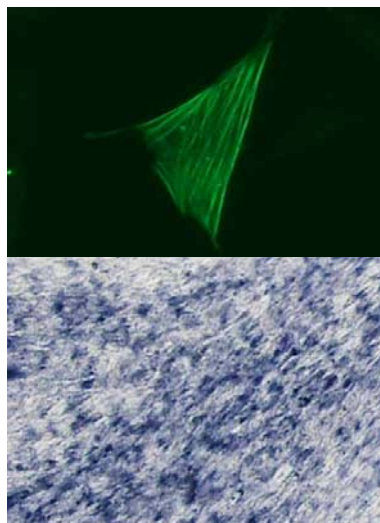
## 4. 研究成果

### ①Nestin 陽性 C6 グリオーマ細胞の分離

レクチン (細胞表面に存在する糖を認識するタンパク) を検討すると、血管周囲の nestin 陽性細胞が、特異的に Soy bean agglutinin レクチン (以下 SBA) に強く反応することがわかった。SBA を用いて nestin 陽性細胞と nestin 陰性細胞を分別することが可能となった。

nestin 陽性細胞および nestin 陰性細胞の性格を把握するために、約 27,000 probe sets が載っている Filgen 社製のマイクロアレイを用いて nestin 陽性細胞及び nestin 陰性細胞

の網羅的遺伝子プロファイルを行った。nestin 陽性細胞には、I 型 collagen, III 型 collagen, Fibrillin-1 等の間葉系細胞に発現する遺伝子が up-regulation されていた。



一方、nestin 陰性細胞では CNPase, SOX10, Proteolipid protein 等のオリゴデンドログリアに発現する遺伝子が up-regulation されていた。実際、TGF beta 1 で nestin 陽性細胞と

nestin 陰性細胞を刺激すると、Alpha Smooth muscle actin 陽性の myofibroblast に分化した細胞が見られた (左図上: Alpha Smooth muscle actin が緑色に染色されている)。また、骨芽細胞へ分化を誘導する培養条件で nestin 陽性細胞と nestin 陰性細胞を培養すると、nestin 陽性細胞のみに alkaline phosphatase 陽性の骨芽細胞様細胞が出現した (左図下: 紫色に染色されている)。以上の結果から、nestin 陽性細胞は間葉系細胞に分化する能力があり、nestin 陰性細胞にはグリア細胞に分化する能力があるものと考えられた。

②Nestin 陽性細胞の ex vivo における抗がん剤に対する耐性のメカニズム。

Nestin 陰性細胞と比較して、nestin 陽性細胞は抗がん剤 etoposide (グリオーマ治療に実際の臨床で使われている) と anthracycline 系の抗がん剤である daunorubicin に対して強い抵抗性を有していた。ヘキスト 33342 排出 assay では nestin 陽性細胞の排出能が nestin 陰性細胞と比較して高いことを証明した。

### ③血管性ニッチを構成する pericyte の分離と遺伝子 profile

Pericyte と動脈壁平滑筋細胞特異的に発現する NG2 (chondroitin sulfate proteoglycans 4) の promotor によって Ds-Red が発現するトランスジェニックマウスから NG2 Ds-Red 陽性/lineage marker 陰性の pericyte rich population と fibroblast rich population を FACS によって採取し、gene profile を比較した。Fibroblast と比較して、pericyte に強くと思われる遺伝子は

187 個であった。Human protein atlas によって、187 遺伝子のタンパク質の免疫染色パターンを検討した。45 個のタンパク質の情報は無く、残り 142 個のタンパク質の免疫染色パターンを検討した。すると 8 個のタンパク質が毛細血管の pericyte に比較的特異的に発現していると考えられた。7 個のタンパク質に対する抗体にて、免疫染色を行った。Melanoma cell adhesion molecule、fatty acid desaturase 3、myosin、light polypeptide kinase、myosin 1B、synaptopodin 2 および platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide はヒトの多くの臓器の pericyte に発現していた。特に myosin 1B の発現は pericyte に選択性が高く pericyte マーカーとして適していると考えられた。

#### 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 3 件)

- ①Kawasaki H, Ogura H, Arai Y, Baba S, Kosugi I, Tsutsui Y, Iwashita T. Aggressive progression of breast cancer with microscopic pulmonary emboli possessing a stem cell-like phenotype independent of its origin. *Pathol Int.* 査読有、60: 228-234, 2010. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02502.x.
- ②Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Iwashita T, Tsutsui Y. Mouse embryonic stem cells inhibit murine cytomegalovirus infection through a multi-step process. *PLoS One.* 2011 6(3):e17492. doi: 10.1371.
- ③Arai Y, Tsuchida T, Kosugi I, Kawasaki H, Meguro S, Kinoshita M, Baba S, Maeda M, Shinmura Y, Tsutsui Y, Iwashita T. Effects of intrapulmonary viral tropism and cytokine expression on the histological patterns of cytomegalovirus pneumonia. *Pathol Int.* 2012 62(9):628-39. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02849.x.

[学会発表] (計 10 件)

- ①ES 細胞におけるサイトメガロウイルス感染感受性の多段階制御とその機序  
河崎秀陽、小杉伊三夫、新井義文、筒井祥博、岩下寿秀、日本病理学会総会 2010、4 月、東京
- ②Bacterial artificial chromosome を用いた組織標本中にウイルスゲノム同定法  
新井義文、河崎秀陽、小杉伊三夫、筒井祥博、岩下寿秀 日本病理学会総会 2010、4 月、東京
- ③発育脳神経細胞におけるサイトメガロウ

イルス感染と脳発達障害：感染細胞における樹状突起の解析

小杉伊三夫、新井義文、河崎秀陽、筒井祥博、岩下寿秀 日本病理学会総会 2010、4 月、東京

④組織標本を用いた間質性肺病変における炎症性サイトカイン発現に関する検討

新井義文、河崎秀陽、小杉伊三夫、馬場聡、筒井祥博、岩下寿秀 日本病理学会総会 2011、4 月、東京

⑤FACS を用いた pericyte と血管平滑筋細胞の分離

赤松泰介、新井義文、河崎秀陽、小杉伊三夫、岩下寿秀 日本病理学会総会 2011、4 月、東京

⑥発育臨界期の脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス感染による樹状突起形成障害

小杉伊三夫、新井義文、河崎秀陽、筒井祥博、岩下寿秀 日本病理学会総会 2011、4 月、東京

⑦サイトメガロウイルス脳急性感染期における integrin beta1 発現と感染分布との関係

河崎秀陽、小杉伊三夫、新井義文、筒井祥博、岩下寿秀 日本病理学会総会 2012、4 月、東京

⑧ヒトサイトメガロウイルス感染胎盤における絨毛血管内皮細胞及び間質細胞の解析

小杉伊三夫、鈴木万幾子、河崎秀陽、新井義文、大月寛郎、岩下寿秀、筒井祥博 日本病理学会総会 2012、4 月、東京

⑨マウス bleomycin 誘発肺線維症から筋線維芽細胞を純化する方法の確立

赤松泰介、新井義文、河崎秀陽、小杉伊三夫、岩下寿秀 日本病理学会総会 2012、4 月、東京

⑨ヒトサイトメガロウイルス感染胎盤における絨毛血管内皮細胞及び間質細胞の解析

小杉伊三夫、鈴木万幾子、河崎秀陽、新井義文、大月寛郎、岩下寿秀、筒井祥博 日本病理学会総会 2012、4 月、東京

⑩サイトメガロウイルス肺炎の病変形成に関する考察

新井義文、小杉伊三夫、河崎秀陽、岩下寿秀、筒井祥博 日本病理学会総会 2012、4 月、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩下寿秀（IWASHITA TOSHIHIDE）  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00283432

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし