

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 1日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591614

研究課題名（和文） エピジェネティック因子の再構築による脳腫瘍ゲノムの機能的解析

研究課題名（英文） Functional analysis of genomic abnormalities in brain tumors by epigenetic reprogramming

研究代表者

八幡 俊男（YAWATA TOSHIO）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：40380323

研究成果の概要（和文）：悪性グリオーマ細胞株に人工多能性幹（iPS）細胞を誘導する遺伝子を導入した。この細胞株を用いてグリオーマ細胞由来の iPS 細胞を誘導した結果、幹細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ陽性の細胞が得られたが、増殖能を欠き、目的の細胞は得られなかった。このことから悪性グリオーマにおいて異常が生じている遺伝子は、ゲノムリプログラミングや胚性幹細胞の維持に必要である可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：To establish induced pluripotent stem (iPS) cell line derived from brain tumor, *NANOG* promoter-*GFP*, *SOX2*, *KLF4* and *OCT3/4* genes were introduced into glioma cells. After the induction of iPS cells, alkaline phosphatase-positive clones were appeared but failed to grow continuously. This result suggests that altered or mutated genes in glioma cells might be required for genome reprogramming and maintenance of pluripotency in embryonic stem-like cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
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、エピジェネティクス、ゲノムリプログラミング

1. 研究開始当初の背景

ゲノムDNAにおける変異や多型が発がんやがん形質に及ぼす影響を探索する「がんゲノム計画」が進められている。しかし、がん組織から得られたゲノム情報だけでは、それらの正常組織との違いが発がんにおける原因なのか結果なのかは正確に知ることが出来ない。これらの異常が細胞系譜上の何れの分

化段階にある細胞に作用し、発がんやがんの生物学的特性を誘導しているかは、推定の域を出ない。これらのことを研究するためには、コンディショナルノックアウトマウス等の遺伝的改変動物を用いた解析が必要であり、ヒトにおける知見を得ることは極めて困難である。

近年、ES（胚性幹）細胞に発現する幹細胞性

を維持する遺伝子の導入により線維芽細胞、肝細胞などの体細胞から iPS 細胞が誘導可能なことが報告された。また、重症免疫不全、ダウン症候群等の患者に由来する細胞から疾患特異的な iPS 細胞を誘導出来ることが示された。この技術は再生医療に貢献するばかりでなく、分化誘導により入手困難な細胞における異常の解析及びこれらの疾患に対する薬剤の開発にも役立つことが考えられる。

従来、がん研究において癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常の発がん、浸潤転移等の癌形質への影響は、遺伝的改変マウスを用いた解析に依存しており、実験結果が必ずしもヒトとは一致しない可能性も常に危惧されてきた。また、倫理的な問題から、研究目的でヒト ES 細胞を遺伝的改変し、その変異によるがん化への貢献度を研究することは困難である。一方、細胞株やがんの変異データベースが充実し、ゲノム解析の高速化に伴い、腫瘍組織及び腫瘍細胞株のゲノム解析も開始された。我々は、グリオーマ細胞株及び組織から癌幹細胞を分離し、その性状の解析を行っているが、腫瘍細胞の起源に関しては特定していない。本研究では、これらの研究の進行方向を考慮したポストゲノムの機能的な解析として、がん細胞から iPS 細胞を誘導し、目的の細胞へと再分化させることにより、倫理的に問題なくがんのゲノム解析のデータベースにより遺伝的変異が同定されたヒト細胞における発ガンに関わる変異の影響と脳腫瘍の起源が検索出来る可能性を模索した。

2. 研究の目的

脳腫瘍細胞株から iPS 細胞を誘導する際に必要な遺伝子を同定する。正常な細胞由来 iPS 細胞と癌由来の iPS 化細胞株のアストロサイト、ニューロン等の神経系細胞への分化誘導時における効率を比較することで、変異の細胞の分化に与える影響を検索する。

3. 研究の方法

悪性グリオーマ細胞株は従来の U87MG、SNB19、T98G 等を用いた。iPS 細胞化の指標として Nanog プロモーター下流に GFP または Puromycin 耐性遺伝子をもつベクターを構築し、あらかじめグリオーマ細胞株に遺伝子導入した。pIRESNeo3 を用いて変異 FKBP 遺伝子を N 末にもつ Sox2、Oct4、Klf4 それぞれの融合遺伝子を発現するコンディショナルベクターを構築した。このベクターを co-transfection でグリオーマ細胞株に遺伝子導入し、クローニング後に RT-PCR により全ての遺伝子を発現する細胞を選出した。この候補クローンに Shield1 を添加することでこれらの遺伝子産物の発現が上昇すること

をウエスタンブロッティングにより確認した。これらのクローンをフィーダー細胞上に播種し、Shield1 の添加により iPS 細胞の誘導を試みた。

4. 研究成果

悪性グリオーマ細胞株において iPS 細胞誘導遺伝子 Sox2、Oct4、Klf4、Nanog の発現を検索した。Sox2 遺伝子は、全ての細胞株で発現していたが、他の遺伝子は、細胞株により異なっており、全ての遺伝子を発現する細胞株は無かった。悪性グリオーマ細胞は、報告されている CD133 や Nestin といった体性幹細胞マーカーに限らず、胚性幹細胞のマーカーも発現することが考えられた。幹細胞を効率的に分離するために、ES 細胞特異的遺伝子である Nanog のプロモーター領域の下流に puromycin 耐性遺伝子を挿入したコンストラクト (pNanog-Puro) を構築し、Nanog 陰性のグリオーマ細胞株に導入した。これらのグリオーマ細胞株を用いてフィーダー細胞上で iPS 細胞を誘導したが puromycin 耐性コロニーは得られなかった。つまり、内在的な ES 細胞特異的遺伝子の発現では、iPS 細胞を誘導するためには不十分であった。次に、Sox2、Oct4、Klf4 のコンディショナルな発現ベクターを pNanog-Puro を導入済みの細胞へ co-transfection 後、サブクローニングした。これらの中から外来性の Sox2、OCT4、Klf4 を mRNA レベルで発現する細胞を選出し、これらの遺伝子産物が誘導可能であることを確認した。これらの細胞を用いて脳腫瘍細胞由来 iPS 細胞を誘導すると ES 細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ陽性の多くの細胞が得られた。



グリオーマ細胞株から iPS 細胞の誘導により出現したアルカリフォスファターゼ陽性コロニー

これらの iPS 候補細胞をクローニングし、増殖させようとしたところ全ての細胞が増殖を停止した。

少ない因子で神経幹細胞から iPS 細胞が誘導可能であることが報告されている。グリオーマの Tumor sphere は神経幹細胞様の細胞を多く含んでいる。iPS 細胞を誘導する遺伝子が不十分である可能性を考慮し、Sox2、OCT4、Klf4 を発現するグリオーマ細胞を Tumor sphere 培養した。これの細胞において

iPS 細胞を誘導したが目的の細胞は得られなかった。

本研究で完全な iPS 細胞が得られなかったことで、今回、用いたグリオーマ細胞において iPS 細胞の維持や完全なリプログラミングのために必要な遺伝子に異常が生じている可能性が示唆された。最近、がん細胞からの iPS 細胞の誘導は効率が極めて悪いことが示唆されている。また、グリオーマ細胞は ES 細胞に類似した発現プロファイルを示しているにも関わらず、未だに iPS 細胞樹立の報告はない。今後は、腫瘍で異常を示すリプログラミングに関わる遺伝子を探索し、相補することによりグリオーマ細胞由来の iPS 細胞の樹立を目指すと共に新たなリプログラミング遺伝子や手法を同定することが必要である。

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 6 件)

- ① Yawata T, Shimizu K: Gene therapy strategies for treating brain tumors: Retroviruses are still good candidates for therapeutic vectors. *Open J Genet.*, 印刷中, 査読有
 - ② Kawanishi Y, Tominaga A, Okuyama H, Fukuoka S, Taguchi T, Kusumoto Y, Yawata T, Fujimoto Y, Ono S, Shimizu K: Regulatory effects of Spirulina complex polysaccharides on growth of murine RSV-M gliomas cells through toll-like receptor 4. *Microbiol Immunol*, 査読有, 57: 63-73, 2013
 - ③ Ohta M, Higashi Y, Yawata T, Kitahara M, Nobumoto A, Ishida R, Tsuda M, Fujimoto Y, Shimizu K: Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury. *Brain Res*, 査読有, 1490: 184-192, 2013
 - ④ Yawata T, Maeda Y, Okiku M, Ishida E, Ikenaka K, Shimizu K: Identification and functional characterization of glioma-specific promoters and their application in suicide gene therapy. *J Neurooncol*, 査読有, 104: 497-507, 2011
 - ⑤ Nakabayashi H, Yawata T, Shimizu K: Anti-invasive and antiangiogenic effects of MMI-166 on malignant glioma cells. *BMC Cancer*, 査読有, 10: 339, 2010
 - ⑥ Yawata T, Nakai E, Park KC, Chihara T, Kumasawa A, Toyonaga S, Masahira N, Nakabayashi H, Kaji T, Shimizu K: Enhanced expression of cancer testis antigen genes in glioma stem cells. *Molecular Carcinogenesis*, 査読有, 49: 532-544, 2010
- [学会発表] (計 28 件)
- ① Shimizu K: Development of a high-titer retrovirus production system for glioma gene therapy. Joint Neurosurgical Convention 2013, 2013/1/29-2/3, Waikoloa, Hawaii, U. S. A.
 - ② Shimizu K: Towards a clinical trial of gene therapy for malignant glioma using highly concentrated retrovirus solution. ESGCT 20th Anniversary Congress in Collaboration with the SFTCG, 2012/10/25-29, Versailles, France
 - ③ 大田 学: 頭部外傷後の軸索損傷と認知機能障害に対するエダラボンの効果の解析. 第 13 回日本分子脳神経外科学会, 2012/9/20-21, 熊本
 - ④ 八幡 俊男: Multidrug-resistance (MDR-1) gene expression and susceptibility of immature glioma cells to drug-induced DNA damage. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012/9/19-21, 北海道
 - ⑤ 東 洋一郎: エダラボンは頭部外傷による軸索損傷を阻止し、記憶障害を改善する. 第 35 回日本神経科学大会, 2012/09/18-21, 愛知
 - ⑥ 川西 裕: Spirulina CPS を用いた悪性神経腫に対する免疫療法の検討. 第 16 回日本がん免疫学会総会, 2012/7/26-28, 北海道
 - ⑦ 八幡 俊男: DNA 障害を指標とした悪性グリオーマ幹細胞の抗癌剤感受性の検討. 第 22 回日本サイトメトリ学会学術集会, 2012/6/29-30, 大阪
 - ⑧ Shimizu K: Multidrug-resistance (MDR-1) gene expression in immature glioma cells. American Association for Cancer Research, Annual Meeting 2012, 2012/3/31-4/4, Chicago, IL, U. S. A.
 - ⑨ Shimizu K: Brain tumor selective gene expression and therapy mediated by recombinant retroviruses containing the SXX4 promoter. ESGCT and BSGT Collaborative Congress 2011, 2011/10/27-31, Brighton, U. K.

- ⑩ 川西 裕：悪性神経膠腫のMGMT発現評価に対する新たな試み。(社)日本脳神経外科学会第70回学術総会, 2011/10/12-14, 神奈川
- ⑪ 八幡 俊男：未分化なグリオーマ細胞における薬剤耐性遺伝子の発現。第70回日本癌学会学術集会, 2011/10/3-5, 愛知
- ⑫ 東 洋一郎：てんかん発作による海馬歯状回神経新生異常に対する亜鉛投与の効果。第34回日本神経科学大会, 2011/9/14-17, 神奈川
- ⑬ 八幡 俊男：悪性グリオーマ内在性の未分化細胞における薬剤耐性遺伝子の発現。第21回日本サイトメトリー学会学術集会, 2011/6/25-26, 京都
- ⑭ 川西 裕：PCR in situ hybridizationを用いたMGMT発現評価の試み。第29回日本脳腫瘍病理学会学術集会, 2011/5/20-21, 東京
- ⑮ Yawata T: Transcriptional targeting of retrovirus vector through the SSX4 tumor-specific promoter. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting, 2011/5/18-21, Seattle, WA, U. S. A.
- ⑯ Shimizu K: Up-regulation and invasive role of MUC18/MCAM in glioma sphere culture. American Association for Cancer Research, 102nd Annual Meeting, 2011/4/2-6, Orlando, Florida, U. S. A.
- ⑰ 川西 裕：Spirulina LPSを用いた悪性神経膠腫に対する免疫療法の検討。第23回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2010/12/9-10, 大阪
- ⑱ 川西 裕：悪性神経膠腫に対するSpirulina LPSを用いた免疫療法。第28回日本脳腫瘍学会学術集会, 2010/11/28-30, 長野
- ⑲ 石田 恵理：生体内イメージングを用いた悪性グリオーマ幹細胞における薬剤抵抗性の解析。(社)日本脳神経外科学会第69回学術集会, 2010/10/27-29, 福岡
- ⑳ 川西 裕：当教室における悪性神経膠腫のMGMT発現評価と予後の検討。(社)日本脳神経外科学会第69回学術集会, 2010/10/27-29, 福岡
- ㉑ 田村 雅一：グリオーマ細胞におけるMUC18の発現の意義とin vivoイメージングを用いた解析。(社)日本脳神経外科学会第69回学術集会, 2010/10/27-29, 福岡
- ㉒ Shimizu K: Development of a suicide gene therapy for the treatment of glioblastoma using tumor-specific retrovirus vectors. 18th Annual Congress of the European Society of Gene & Cell Therapy, 2010/10/22-25, Milano, Italy.
- ㉓ 東 洋一郎：てんかん発作による海馬歯状回神経新生異常に対する亜鉛投与の効果。第44回日本てんかん学会, 2010/10/14-15, 岡山
- ㉔ 八幡 俊男：グリオーマスフェアにおけるMUC18の発現亢進とその浸潤における役割。第69回日本癌学会学術総会, 2010/9/22-24, 大阪
- ㉕ 八幡 俊男：悪性グリオーマ細胞移植モデルマウスにおける腫瘍動態及び細胞周期イメージング。第11回日本分子脳神経外科学会, 2010/8/27-28, 宮城
- ㉖ Yawata T: Evaluation of SSX4 gene promoter for tumor-specific suicide gene therapy. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会, 2010/7/1-3, 栃木
- ㉗ Yawata T: An efficient targeted gene therapy using brain tumor-specific promoter. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting, 2010/05/19-22, Washington, DC, U. S. A.
- ㉘ Shimizu K: Development of brain tumor-specific targeted system by using retroviral-mediated gene therapy with SSX4 promoter. American Association for Cancer Research, 101st Annual Meeting 2010, 2010/4/17-21, Washington, DC, U. S. A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八幡 俊男 (YAWATA TOSHIO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：40380323

(2) 研究分担者

清水 恵司 (SHIMIZU KEIJI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：70116044
東 洋一郎 (HIGASHI YOICHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：80380062
田村 雅一 (TAMURA MASAKAZU)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：40516150
(H22→H23)