

## 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 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659263

研究課題名（和文）腫瘍幹細胞の同定に基づく下垂体腺腫の発生メカニズム解明と新規治療法への応用

研究課題名（英文）Mechanism of generation of pituitary adenomas based on the identification of pituitary tumor stem cells

研究代表者

矢野 茂敏（YANO SHIGETOSHI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：60332871

研究成果の概要（和文）：

下垂体腺腫における腫瘍幹細胞の存在を明らかとし、腫瘍発生および増大における関与と分化による腫瘍多様性の関係を明らかにするために、手術摘出標本から下垂体腫瘍幹細胞の培養を行った。非機能性下垂体腺腫 2 例、GH 産生性下垂体腺腫 1 例、ACTH 産生性下垂体腺腫 1 例において安定した sphere 形成が確認され、分化条件の培養液に変更し培養を継続したところ、GH 産生性および ACTH 産生性下垂体腺腫より形成された sphere から、それぞれ GH および ACTH 分泌細胞への分化が免疫染色で確認された。また非機能性下垂体腺腫から抽出された下垂体腺腫幹細胞を分化誘導すると、GH および PRL 陽性の細胞が認められた。さらに摘出組織の免疫染色にて、腫瘍組織内に Nestin 陽性の細胞の存在が確認された。これらの結果から、下垂体腺腫組織内には、多方向に分化する能力を有した下垂体腫瘍幹細胞が存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the presence of tumor stem cells in the pituitary adenoma, and to clarify the relationship of tumor diversity and tumor development, we cultured pituitary tumor stem cells from surgical resected specimen. Stable sphere formation was obtained in two cases of non-functioning pituitary adenoma, one case of GH-secreting pituitary adenoma, and one case of ACTH-secreting pituitary adenoma. In the condition of differentiation media, sphere cells obtained from GH-secreting pituitary adenoma or ACTH-secreting pituitary adenoma were positively immunostained with anti-GH antibody or anti-ACTH antibody, respectively. When inducing differentiation of pituitary adenoma stem cells extracted from the non functional pituitary adenoma was performed, positive PRL and GH immunostaining became to be observed. Furthermore, the presence of Nestin-positive cells was observed in tumor tissue. From these results, the pituitary tumor stem cells may exist in the tumor tissue and have the ability to differentiate into multiple directions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	0	800,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	330,000	2,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳腫瘍学

キーワード：下垂体腺腫、腫瘍幹細胞、内視鏡手術、下垂体ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

下垂体腺腫は原発性脳腫瘍のおよそ2割を占める良性脳腫瘍の代表であるが、腫瘍の発生・増大メカニズム、ホルモン産生メカニズムに関しては不明な点が多い。近年、悪性腫瘍において腫瘍幹細胞の存在が確認され (Singh, 2004)、腫瘍発生や増大のメカニズムが考え直されるようになってきているが、最近、ラトケ囊周囲に下垂体幹細胞が存在することがマウスの実験より明らかとなり (Gleiberman, 2008)、さらに下垂体腺腫にも腫瘍幹細胞が存在する可能性が報告された (Xu, 2009)。これらの報告から、下垂体腺腫は腫瘍幹細胞が刺激を受けてさまざまな分化方向に進みさらに増殖することにより発生するのではないか？また下垂体腺腫の腫瘍幹細胞の分化誘導実験などによって、治療抵抗性の腫瘍を薬剤感受性の腫瘍に形質転換させる遺伝子が発見できるのではないか？という仮説が浮かび上がった。

Singh SK, Hide T et al Identification of human brain tumour initiating cells *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):396-401.

Gleiberman AS et al Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 29;105(17):6332-6337.

Xu Q, et al Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours. *Br J Cancer*. 2009 Jul 21;101(2):303-311

## 2. 研究の目的

本研究においては、下垂体腺腫における腫瘍幹細胞の存在を明らかとし、腫瘍発生および増大における関与と分化による腫瘍多様性の関係を明らかにする。さらに腫瘍幹細胞の分化誘導による薬剤感受性獲得の可能性を探ることを目的とした。

具体的に明らかにしようとしたことは、

- 1) ヒト下垂体腺腫において実際に腫瘍幹細胞は存在するか？
- 2) 腫瘍幹細胞を分化刺激することで、異なる種類の腫瘍を形成することができるか？
- 3) 分化誘導された腫瘍は薬剤感受性を獲得できるか？

以上の点を明らかにすることにより、下垂体腺腫発生のメカニズム、ホルモン産生のメカニズムを考察した。

## 3. 研究の方法

### 1) 下垂体腺腫摘出標本の分析

- ① 摘出直後より初代培養を行い、幹細胞の培養を行った。
- ② パラフィン固定を行い、以下の抗体を用いて染色を行った。  
免疫染色 : Nestin, Sox2, CD133 抗体  
ホルモン染色 : FSH, GH, PRL 抗体  
MIB-1 染色

### 2) 下垂体幹細胞を濃縮し、分化刺激を行い、ホルモン染色でどのように分化したかを観察した。

### 3) 下垂体幹細胞をマウス脳内に移植し、生着を観察した。

## 4. 研究成果

### 1) 手術により摘出された下垂体腺腫患者標本を迅速に DMEM/F12, B27+EGF, bFGF 培養液で培養した。

症例は非機能性下垂体腺腫 5 例、GH 産生性下垂体腺腫 6 例、PRL 産生性下垂体腺腫 4 例、ACTH 産生性下垂体腺腫 3 例であった。

うち大型の非機能性下垂体腺腫 2 例、GH 産生性下垂体腺腫 1 例、ACTH 産生性下垂体腺腫 1 例において安定した sphere 形成が確認された (図 1)

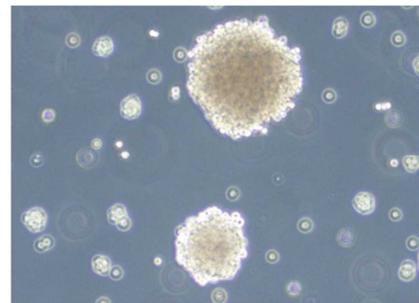


図 1 下垂体腺腫より得られた sphere

2) 細胞を分化条件の培養液に変更し培養を継続したところ、GH 産生性および ACTH 産生性下垂体腺腫より形成された sphere からの細胞分化が認められ、それぞれ GH および ACTH での染色性が確認された。これにより、下垂体腺腫の組織内に下垂体幹細胞が存在する可能性が示された。

3) 下垂体腺腫患者標本をパラフィン固定し、腫瘍幹細胞の指標である Nestin に対する抗体で免疫染色を行った。非機能性下垂体腺腫 9 例中 6 例、GH 産生性下垂体腺腫 4 例中 2 例、PRL 産生性下垂体腺腫 4 例中 3 例、ACTH 産生

性下垂体腺腫 2 例中 2 例で Nestin 陽性細胞が観察された (図 2)。

また、Glioma においてはすでに報告されているが、腫瘍幹細胞の指標である ALDH1 の抗体で染色し、腫瘍細胞に部分的に染色性が認められたが、術前の増大速度や MIB-1 との明らかな関連性は見出されなかった。

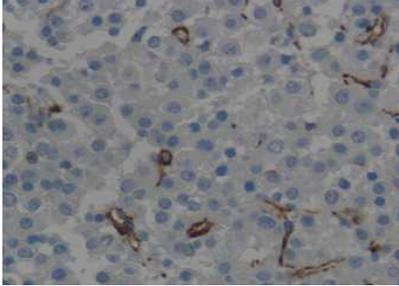


図 2 下垂体腺腫における Nestin の発現

4) 培養した下垂体腫瘍幹細胞をマウス脳内に移植すべく実験を行ったが、細胞数が増大する速度が遅いため、十分量の幹細胞が回収できず、安定して幹細胞をマウスに移植することができなかった。

また、凍結保存した下垂体幹細胞を再培養したところ、細胞数の増加速度が遅くなっていた。保存環境には問題がないと思われたが、増殖条件の調整など検討が必要である。

以上の実験結果から、下垂体腺腫の中には下垂体腫瘍幹細胞が含まれている可能性が示されたが、どの程度含まれているのか、人為的に分化誘導が可能なのか、治療のターゲットになりうるかについては、今後のさらなる研究が必要と考えられた。

## 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 9 件)

① Yamamoto T, Yano S, Kuroda J, Hasegawa Y, Hide T, Kuratsu J. Pituitary apoplexy associated with endocrine stimulation test: endocrine stimulation test, treatment, and outcome. Case Report Endocrinol. 2012:826901, 2012、査読あり

② Makino K, Nakamura H, Hide T, Yano S, Kuroda JI, Takahashi Y, Iyama KI, Kuratsu JI. Usefulness of immunohistochemical expression analysis of metabolic-related molecules to differentiate between intracranial neoplastic and non-neoplastic lesions. Brain Tumor Pathol. Oct 12, 2012、査読

あり

③ 矢野茂敏、秀 拓一郎、倉津純一. GH 産生性下垂体腺腫における治癒率向上のための工夫—術中正常化予測因子の検討—. 日本内分泌学会雑誌 88 suppl:11-13, 2012、査読なし

④ Nakamura H, Makino K, Yano S, Kuratsu J; Kumamoto Brain Tumor Research Group. Epidemiological study of primary intracranial tumors: a regional survey in Kumamoto prefecture in southern Japan—20-year study, Int J Clin Oncol., 16(4):314-321, 2011、査読あり

⑤ Hasegawa Y, Yano S, Sakurama T, Ohmori Y, Kawano T, Morioka M, Chen H, Zhang JH, Kuratsu J. Endoscopic surgical treatment for pituitary apoplexy in three elderly patients over the age of 80. Acta Neurochir Suppl. 111:429-433, 2011、査読あり

⑥ 矢野茂敏、秀 拓一郎、倉津純一. プロラクチノーマに対する内視鏡下被膜摘出術の有用性と問題点. 日本内分泌学会雑誌 87 suppl:64-66, 2011、査読なし

⑦ Sasao A, Hirai T, Nishimura S, Fukuoka H, Murakami R, Kitajima M, Okuda T, Akter M, Morioka M, Yano S, Nakamura H, Makino K, Kuratsu JI, Awai K, Yamashita Y. [Assessment of vascular supply of hypervascular extra-axial brain tumors with 3T MR regional perfusion imaging.](#) AJNR Am J Neuroradiol. Mar;31(3):554-558, 2010、査読あり

⑧ Makino K, Nakamura H, Yano S, Kuratsu J; Kumamoto Brain Tumor Group. [Population-based epidemiological study of primary intracranial tumors in childhood.](#) Childs Nerv Syst. 2010 Aug;26(8):1029-1034、査読あり

⑨ 矢野茂敏、河野隆幸、秀 拓一郎、工藤真励奈、倉津純一. 内視鏡単独下垂体腺腫摘出術の進歩—経験と改善から振り返った治療成績の変化—. 日本内分泌学会雑誌 Vol186: Suppl. 57-59, 2010、査読なし

[学会発表] (計 7 件)

① 矢野茂敏. 脳神経外科領域における内視鏡手術の最新知見. 第 77 回切塚会 2013.2.1、秋田脳研 (秋田)

② 矢野茂敏, 秀 拓一郎, 篠島直樹, 黒田順一郎, 河野隆幸, 倉津純一, 内視鏡単独経鼻的頭蓋底手術の適応と注意点, (シンポジウム) 第71回日本脳神経外科総会 2012. 10. 20、大阪国際会議場 (大阪)

③ 矢野茂敏. 内視鏡下経鼻的頭蓋底手術の現状と展望. 第31回ニセコカンファレンス 2012. 8. 18、中村記念病院 (北海道)

④ 矢野茂敏. 内視鏡単独拡大経蝶形骨洞手術に必要な外科解剖. 第32回日本脳神経外科コンgres総会, 第26回微小脳神経外科解剖セミナー合同セッション 2012. 5. 12、パシフィコ横浜 (神奈川)

⑤ 矢野茂敏, 秀 拓一郎, 倉津純一, GH産生性下垂体腺腫における治癒率向上のための工夫—術中正常化予測因子の検討—第22回日本間脳下垂体腫瘍学会 2012. 2. 24、東京ステーションカンファレンス (東京)

⑥ 矢野茂敏. 間脳下垂体部腫瘍の内視鏡手術—その現状と課題—. 第46回大分脳腫瘍懇話会 2011. 2. 2、大分県立病院 (大分)

⑦ 矢野茂敏, 河野隆幸, 秀 拓一郎, 工藤真励奈, 倉津純一, 内視鏡単独下垂体腫瘍摘出術の進歩—経験と改善から振り返った治療成績の変化—, (シンポジウム) 第20回日本間脳下垂体腫瘍学会 2010. 2. 19 兵庫医科大学 (兵庫)

[図書] (計3件)

① 矢野茂敏. 内視鏡下経蝶形骨手術: 私の手技—両側鼻腔法. NS NOW19, 下垂体外科 Update 大きく変わった経蝶形骨手術, メジカルビュー社, 67-80, 2012

② 矢野茂敏. 下垂体腺腫. 今日の治療指針, 医学書院, 739, 2010

③ 矢野茂敏, 倉津純一. 髄膜腫の自然史と治療戦略—無症候性髄膜腫にいかに対応すべきか? NS NOW9, 無症候性脳外科疾患の治療戦略 どう捉え、どう解決するか, メジカルビュー社, 115-120, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢野 茂敏 (YANO SHIGETOSHI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号: 60332871

### (2) 研究分担者

秀 拓一郎 (Hide Takuichiro)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 40421820

倉津 純一 (Kuratsu Jun-ichi)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 20145296