

## 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24年 5月15日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700905

研究課題名（和文）ヒトグリオーマ幹細胞樹立と新規マーカー分子群の解析

研究課題名（英文）Establishment of Glioma stem-like cells (GSC) from glioma patient tumors and analysis of the novel molecular markers of GSC by an integrated proteomics.

研究代表者

南部 晶子 (NANBU AKIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・産学連携研究員

研究者番号：40572087

研究成果の概要（和文）：本研究では、悪性脳腫瘍患者組織から、グリオーマ様幹細胞(GSC)を単離・樹立することに成功し、これらの細胞を用いて、血清による分化誘導前後の特異的発現分子群を融合プロテオミクス法により解析した。GSCは神経系幹細胞用培地を用いて長期培養が可能であること、がん幹細胞に特異的なsphere形成能、および神経幹細胞、および脳腫瘍関連マーカーを発現こと、またこれらが免疫不全マウス頭蓋内移植モデルにて、glioblastomaを形成することを確認した。これらの細胞を用いて、DNAアレイおよびプロテオミクス差異解析法(iTRAQ法/2D-DIGE法)にて30000分子群の定量的同定と統合データマイニングを行い、GO解析に供したところ、分化誘導時における特異的発現亢進分子群として細胞接着に関与する分子群が注目された。細胞生物学的検証実験の結果、GSCの分化誘導により細胞外マトリックス(ECM)やインテグリンを含む接着因子群の発現が顕著に亢進しており、これらの阻害剤で分子機能を抑制する事によって、GSCの分化誘導が顕著に抑制されることが明らかになった。以上のことから、GSCは分化誘導時においてECMを自己分泌し、分化誘導のための特異的微小環境を形成する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Glioma stem cells (GSCs) are thought to be responsible for the therapeutic resistance and recurrence of malignant glioma. The molecules regulating the maintenance/differentiation of these cells are considered effective therapeutic targets. In this study, we established GSC clones from tumors of malignant glioma patients and subjected them to integrated proteomics to survey the proteins and mRNAs differentially expressed in GSCs after they have been induced by serum stimulation. This resulted in the identification of 30000 molecules and GO analysis revealed that the expression of cell adhesion molecules, including integrin subfamily members and extracellular matrices (ECMs) was significantly upregulated during GSC differentiation. After the cell-biological validations, we found that serum factor-induced coupling of ECMs to integrin  $\cdot$  V via the RGD motif are absolutely important for early events in GSC differentiation and proliferation. The results raised the possibility that GSC induces/secretes ECMs by itself to form a specific microenvironment, called the "differentiation niche", which facilitates the development of malignant glioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：プロテオミクス解析、がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍は化学療法が最も困難で致死率の高い予後不良の悪性腫瘍である。現在のところ、予後を予測できる診断マーカーは存在せず、患者の化学療法感受性を見極める診断法や治療ターゲットの開発は早急に取り組むべき重要な課題とされている。近年、癌の根治療法において、高い抗がん剤耐性、放射線抵抗性、腫瘍形成能を持つがん幹細胞が新たなターゲットとして、注目されている。悪性脳腫瘍においても、glioma 様幹細胞 (GSC) の存在が示唆され、治療につながる研究成果が期待されている。しかしながら、glioma 由来の癌幹細胞精製法や長期培養法が確立されていないこと、癌幹細胞のマーカー分子はもとより、癌幹細胞の生化学的特徴や機能を説明する分子情報は非常に乏しい。さらには、癌幹細胞から非幹細胞性腫瘍細胞への分化誘導のスイッチングに関わる特定の遺伝子などを説明する報告はほとんどないのが現状である。そこで本研究では、glioblastoma 患者組織から分離される GSC、およびこれを分化誘導させて得られた腫瘍細胞に焦点をあて、本実験に用いる癌幹細胞の樹立と分化誘導法の確立を試みた。また、超高感度融合プロテオミクス解析技術を用いることにより、GSC の分化を制御する分子群を明らかにし、新規治療ターゲットになり得る分子群の同定を行った。これらの細胞から、脳腫瘍の治療ターゲットや予後予測をより正確に診断するための臨床マーカーや、化学療法非感受性の症例に対する有効な治療薬の開発を推進する分子の基礎情報を得ることを目標にした。

## 2. 研究の目的

悪性 glioma は脳腫瘍の中でも最も化学療法が困難な、致死率の高い難治性疾患の一つである。癌の根治療法において、癌幹細胞を標的とした研究とこれまでの治療を融合させた新たな治療の創出が期待されているが、幹細胞マーカー分子はもとより、増殖・分化誘導に関わる分子群の詳細な解析例はほとんど報告されていない。本研究では glioma の新規治療法・新規診断マーカーの立案を最終目的とし、glioma 患者から癌幹細胞を単離・樹立し、その長期培養方法と分化誘導法の確立を目標とした。さらに樹立した GSC の分化誘導前後において変動する分子群を、融合プロテオミクス法を用いて網羅的に解析し、新規分子標的薬および脳腫瘍診断マーカーになり得るターゲット分子を探索することを課題とした。

## 3. 研究の方法

GSC 樹立および脳腫瘍癌幹細胞の増殖・分化のスイッチングに関わる分子群の同定のため、1) glioblastoma 患者組織サンプルからの癌幹細胞単離と長期培養法と癌幹細胞評価法を用いた癌幹細胞の生物学的性格の確認 2) GSC/GSC 分化誘導細胞を用いた融合的プロテオーム解析と分化・増殖に関わる分子の網羅的同定と発現・機能プロファイリング 3) データ統合による分化・増殖に関連する分子群の抽出 4) 新規に同定された関連分子群についての各種阻害剤を用いた細胞生物学的/生化学的検討を行った。

**1) Glioblastoma 患者からの癌組織を用いた GSC の樹立および GSC 評価法による解析**

Glioblastoma 患者から癌幹細胞を単離するため、外科的摘出術直後の患者グリオーマ組織から、グリーマ様細胞を分離した。成長因子 (EGF, FGF) を含む神経系幹細胞用培地を用いて長期培養し、がん幹細胞に特異的な sphere 形成能、および神経幹細胞 (Nestin, Sox2, Tuj1) および脳腫瘍関連マーカー (CD133, GFAP, vimentin, MiB1) を発現する GSC クローンを樹立した。またこれらが、免疫不全マウス頭蓋内移植モデルにて、glioblastoma を形成することを確認した。

## 2) GSC の増殖・分化のスイッチングに関わる分子群の探索・同定

単離した GSC を血清存在下 (10% FBS)にて、2 日および7日間の分化誘導を行い、その分化誘導細胞と癌幹細胞からそれぞれ細胞の可溶性蛋白質、mRNA を抽出・調整した。これらを、融合プロテオミクス(以下に記述、2D-DIGE 法、iTRAQ 法、DNA array 法)による詳細な蛋白質/mRNA の定量的差異解析を行った。

### ① 二次元電気泳動蛍光差異解析法 :

2D-DIGE 法 (fluorescence difference 2-D gel electrophoresis technology)

それぞれのサンプルから調製した蛋白質を Cy2, Cy3, Cy5 標識し、それぞれの組み合わせによって混合した後、二次元電気泳動によって分離後、蛍光スキャナーにより検出し、約 3500 スポットの定量的解析を行った。定量と統計解析には DeCyler 2D 解析ソフトを用いた。特異的に発現が上昇、あるいは現象するものとして検出された蛋白質スポットは泳動ゲルから単離し、消化酵素処理後、MOLDI-TOF-TOF、あるいは nanoLC-QQ-TOF-MS によって部分アミノ酸配列を決定し、MASCOT データベースによるホモロジー解析により蛋白質を同定した。

### ② iTRAQ 法 (protein quantitaion by

### amine-reactive isobaric tagging reagents)

GSC03A および GSC03U の2クローンを用い、誘導前後の8サンプルにおいて調製した蛋白質を、8-plexiTRAQ 試薬によってそれぞれ標識し、これらの混合サンプルをトリプシン分解後、40 fraction に分画し、すべての fraction の網羅的な定量的同定解析をタンデム型質量分析器 (nanoLC-ESI-Qq-TOF, nanoLC-MALDI-TOF-TOF) によって行った。データ解析には protein pilot 解析ソフトウェアを用いた。

### ③ DNA アレイ法

プロテオミクスに用いたサンプルと同じ細胞から (分化誘導前後の計 8 サンプル) の mRNA を調製し、Affimetrix U133 チップによって mRNA differential 解析を行った。定量および統計解析は gene springs および subio platform を用いた。

## 3) データ統合による特異的シグナル分子群の選択とシグナルネットワークの抽出

得られた全てのデータ iPEAHC (独自のアルゴリズム)による統合マイニング法によって、蛋白質、mRNA 両方の発現が上昇、あるいは減少している分子群を解析・選定した。得られたデータは欧州バイオインフォマテイクス研究所 (EBI) が提供する Gene Ontology Annotation (GOA) データベースに基づいて、抽出されてきたタンパク質分子群の生物学的役割および分子機能を網羅的に推定した。また分子ネットワーク解析ソフト (KeyMolet) によって、特異的シグナルネットワークを抽出した。

## 4) 抽出された分子群の検証 (validation)

同定された分子群の中で最も重要と思われる分子群を GO 解析によって選択し、それらの阻害剤および阻害抗体を用いて細胞形態学的変化の観察および腫瘍マーカー、神経幹細胞マーカーの発現確認、機能解析を行った。

#### 4. 研究成果

本研究ではグリオーマ幹細胞の分化誘導に関わる分子の探索・同定および分化誘導機構の解明を目的とし、GSCの樹立、これらの悪性グリオーマ分化誘導モデルの作成、および分化誘導前後の特異的発現差異分子群の融合プロテオミクス法による解析を行った。ヒト患者腫瘍組織からGSCを9クローン(11検体; glioblastoma: 8検体, anaplastic astrocytoma: 1検体)を単離・樹立した。このうち3クローン

(GSC03A, GSC03U, GSC07U)が6-16週内にマウス同所性移植にて、Ki67

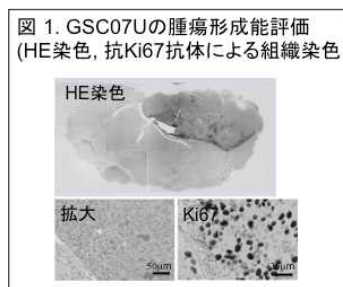
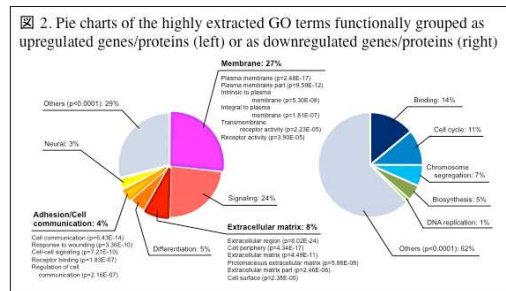


図1. GSC07Uの腫瘍形成能評価 (HE染色, 抗Ki67抗体による組織染色)

陽性の悪性グリオーマを形成した(図1)。次に特性解析を行なった結果、GSCは幹細胞マーカーCD133、Sox2の発現を認め、血清添加による分化誘導によってこれらが減少し、GFAP(アストロサイトマーカー)、Tuj1(分化マーカー)、CD44(悪性腫瘍マーカー)の発現を誘導することから、細胞は神経幹細胞様の性質とグリオーマ細胞への分化能を有していることが判明した。その中の2クローン(GSC03A, GSC03U)を用いて融合プロテオミクスを用いて解析した結果、現在のところiTRAQ法では約5,600個のタンパク質を同定し、そのうち定量的に有意な4191分子を、またDNA microarrayでは定量的に有意な20,752分子が同定された。全てのデータを統合マイニングし、分化誘導によって変動する1,458分子を用いてGene Ontology(GO)解析を行った結果、extracellular region( $p < 1.64E-11$ )、extracellular matrix( $p < 3.40E-3$ )、cell adhesion( $p < 7.33E-3$ )等が抽出されたこと

から、特に細胞接着因子群(細胞外マトリックス: COL4A1, COL2A1, FN1, LAMA2; 接着因子群: ITGA2, ITGAV)に注目した(図2)。

細胞生物学的な検証実験の結果、integrin  $\alpha V$ 、 $\alpha 2$ の接着因子と細胞外マトリックスであるfibronectin, CollagenIVが分化誘導時に優位に



発現誘導されることが判明した。血清添加による分化の促進に対して、阻害剤であるintegrinの中和抗体とペプチドを用いた阻害実験により検証を行った。特にintegrin  $\alpha V$ とfibronectinを介した分化誘導は $\alpha V$ 中和抗体と、その結合配列阻害ペプチドであるRGDペプチドによって顕著に阻害されたこと(図3)、

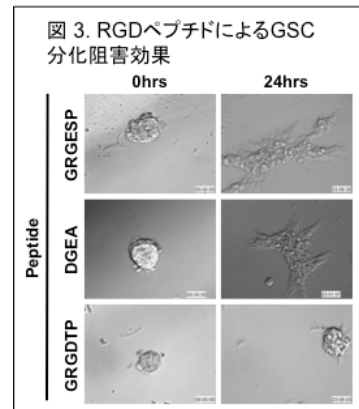


図3. RGDペプチドによるGSC分化阻害効果

GSCは分化誘導時において細胞内にfibronectinの優位な発現上昇を認め

たことから、GSCはfibronectinを始めとする細胞外マトリックスを自己分泌し、細胞自らが分化するための特異的な微小環境を作り出していることが示唆された。これらの結果から、接着因子と細胞外マトリックスを発現制御することで、GSCの分化誘導を制御できる可能性が考えられた。

また、悪性脳腫瘍の第一選択薬である抗がん剤temozolomide(TMZ)とRGDペプチド併用

により GSC の cell viability が TMZ 濃度依存的に減少した。TMZ と RGD ペプチド併用における細胞のアポトーシスレベルを FACS 法により検討した結果、TMZ、RGD ペプチド単独時と比較して、RGD ペプチドと TMZ 併用によって細胞の G1 期 (増殖期) が減少し、アポトーシス分画が増加していることが明らかとなり、これらの分子ターゲット試薬がグリオーマ治療に有効である可能性が示唆された。現在、同所性移植動物モデルにおいて、RGD ペプチドおよび TMZ 投与により腫瘍形成を阻害できるかどうか検証中である。現在までに 3 クローンの特性解析が終了しているが、今後さらに GSC クローンの樹立を行い、グリオブラストーマを形成する 10 クローン以上の樹立を目標としている。また融合プロテオミクス法による解析に 2D-DIGE 法 (fluorescence difference 2-D gel electrophoresis technology) 解析結果を加え、最もターゲットとなり得る分化誘導分子群の抽出を行い、データベースの作成を行う。その後、分化誘導モデルを用いて、同定された分子群の生物学的検証、mRNZ 干渉法 (siRNA) による機能解析を行い、動物移植モデルでの検証実験を行う予定である。

本研究は癌幹細胞特異的に発現する分子を最先端のプロテオミクス解析技術を用いて解析する新しい試みであり、今後の継続的な基盤的研究につながることを証明したものである。これらの技術を用いることにより脳腫瘍のみならず、多種の癌幹細胞に応用でき、新たな癌治療戦略になり得ることが期待される。また、本分化モデルを用いて GSC における種々の抗がん剤の網羅的なスクリーニングを行うことも可能であると考えている。

以上のことから、本研究「融合プロテオミクス解析技術を用いた最先端のがん幹細胞

発現分子の機能解析並びに分化誘導におけるスイッチング機構の解明」は独創的かつ十分に実現可能な試みであり、今後の脳腫瘍がん幹細胞研究の基盤となる多くの新しい発見をもたらすと期待される。得られた情報はがん幹細胞を含む腫瘍の根治治療に繋がる治療ターゲットや創薬の開発に有用であると考えられる。

#### 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)

[学会発表] (計 6 件)

[口答発表]

1. 南部 晶子, 緑川 宇一, 水口 惣平, 長山 慈, 永井 美奈子, 平野 久, 荒木 令江”融合プロテオミクスによる幹細胞様グリオーマの分化制御機構の解析”第 84 回日本生化学会大会、京都、国立京都国際会館 (2011. 9. 21-24).

2. 緑川 宇一, 新堀 晶子, 水口 惣平, 新森 加奈子, 丸尾 裕二, 鶴沼 豊, 中村 眞, 荒木 令江. 「プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群のプロファイリング解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB), 神戸、神戸ポートアイランド (2010. 12. 7-10).

3. S. Mizuguchi, T. Morikawa, N. Tsubota, U Midorikawa, M. Nagayama, D. Kobayashi, A. Niibori, A. Wilson, M. Wilson Morifuji, H. Nakamura, J. Kuratsu, N. Araki. “The functional study of vimentin network involved in chemo sensitivity of gliomas using integrated proteomics data processing/mining approach” *The Human Proteome Organization (HUPO) 9<sup>th</sup> Annual World Congress*, Sydney. Australia, September 19-23, 2010.

[ポスター発表]

4. 南部 晶子, 緑川 宇一, 水口 惣平, 長山 慈, 永井 美奈子, 平野 久, 荒木 令江”融合プロテオミクスによる幹細胞様グリオーマの分化制御機構の解析”第 84 回日本生化学会大会、京都、国立京都国際会館 (2011. 9. 21-24).

5. 緑川 宇一, 新堀 晶子, 水口 惣平, 新

森 加奈子, 丸尾 裕二, 鷗沼 豊, 中村 眞, 荒木 令江. 「プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群のプロファイリング解析」第 33 回分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB), 神戸、神戸ポートアイランド(2010. 12. 7-10).

6. S. Mizuguchi, T. Morikawa, N. Tsubota, U Midorikawa, **A. Niibori**, D. Kobayashi, H. Nakamura, J. Kuratsu, N. Araki. “Integrated proteomics of cancer cellular activation signals related to chemotherapy resistances” 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB), 神戸、神戸ポートアイランド (2010. 12. 7-10).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南部 (新堀) 晶子 (NANBU AKIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・産学連携研究員

研究者番号: 40572087

### (2) 研究協力者

荒木 令江 (ARAKI NORIE)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号: 80253722

水口 惣平 (MIZUGUCHI SOUHEI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・産学連携博士研究員

研究者番号: 50398103

緑川 宇一 (MIDORIKAWA UICHI)

熊本大学・大学院医学教育部・博士課程 4 年