

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659647

研究課題名(和文) 脳腫瘍の階層・多様性の解明

研究課題名(英文) The hierarchy and heterogeneity of malignant brain tumor

研究代表者

副田 明男 (SOEDA, Akio)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20444276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：我々は悪性脳腫瘍患者よりCD133等のマーカーに頼らない方法でcloneを樹立した。一人の患者から得たcloneは幹細胞培養条件下でcoatingが無くても接着するものもあれば、浮遊するものもあり、Sox2などの幹細胞マーカーを発現しているが、成長速度、表面マーカー、浸潤能、腫瘍形成能等に差異がある。また、cDNA micro arrayにより4つの遺伝子はその差異を司っている可能性を発見した。以上より、悪性脳腫瘍には異なった性格をもつcloneが存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Empirically or pathologically, cancers are composed of heterogeneous mixtures of cells that exhibit distinct phenotypic characteristics and proliferative potential. However, previous studies have not determined whether only single cancer stem cells (CSCs) are representative of patients' tumors. Here, we established 4 subclones from a brain tumor patient, and demonstrated that the subclones exhibited dissimilar cellular morphologies and proliferative potential, contained distinct populations of cells, and displayed different sensitivities to the drug. Moreover, we showed that tumor progression and invasion and animal survival were distinct. Our work suggests that subclones derived from single cells obtained from a patient's tumor can produce heterogeneous self-renewing progenies in both in vitro and in vivo settings.

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：悪性脳腫瘍 脳腫瘍幹細胞

1. 研究開始当初の背景

約 10 年前に提唱されたがん幹細胞仮説によると、癌もしくは腫瘍幹細胞とは、自己複製能を有し二次腫瘍を形成する元となる細胞であり、真の治療目的は全腫瘍ではなくがん幹細胞であるとされた。その後、iPS 細胞が発見され、がん幹細胞を頂点とした一方向性のがんの分化は理論的には否定された。しかし、がん細胞の中に幹細胞様の性質を維持した細胞群が存在する事は明らかであり、腫瘍形成において重要な役割を担っているのは事実である。

このため、がん幹細胞を標的とした治療法が研究されているが、果たして一人の患者に対して一株のがん幹細胞株が患者の phenotype の全てを表現しているかは疑問の残るところであった。

2. 研究の目的

Glioblastoma multiforme はその名の通り多様な細胞が入り交じった悪性脳腫瘍であるが、その多様性に関しては病理組織診断レベルによるもので細胞分子学的には明らかでない。

本研究の目的は、悪性脳腫瘍患者の細胞一個一個がどのような多様性を持ち、そこに階層が存在するかを探索する事にある。また、個々から樹立された安定した細胞株を用いて、悪性度・薬剤反応性の差異、またその発生メカニズム等を検証することであった。

3. 研究の方法

<研究に使用した細胞>

数年に渡り約 10 名の患者から約 300 の clone を培養した。多くが既報通りに EGF 及び FGF 添加により sphere を形成し、そこから得た clone も sphere を形成することが多かった。しかし、形態学的に明らかに異なる clone のみを引き続き培養することにより、一名のアメリカ人悪性脳腫瘍患者より全く形態の異なった clone を樹立する事が出来た。

この同一の患者から得た全く異なった形態の clone を用いて脳腫瘍の多様性・階層を明らかにすることを試みた。

<実際の研究方法>

神経幹細胞及び脳腫瘍幹細胞の培養方法は EGF/FGF の添加による浮遊培養か、coating 剤を用いた接着培養であるが、我々の clone は coating が無くても接着するものもあれば、浮遊するものもある。これは、培養方法論を再考すべく知見である。

これらの clone は全て Sox2, Nestin, Musashi などの幹細胞マーカーを発現しているが、成長速度、表面マーカー、浸潤能 (マトリゲルアッセイ) 等に差異があり、免疫不全マウスへの移植により腫瘍形成能を確認した。

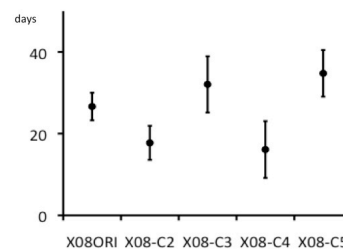
我々は western blot などを用いて PTEN, p53 など一般的にがん化に必要とされる因子

を探索して来たが、いまだ決定的な結果は得られていない。また、上清に関しても Eliza 等により特定の成長因子の発現の差異を比較して来たが、これも同じく結論を得ていない。我々は腫瘍形成と同時に cDNA micro array, プロテオソーム解析などを用いて網羅的に差異を検索し腫瘍形成との matching gene を検索する。

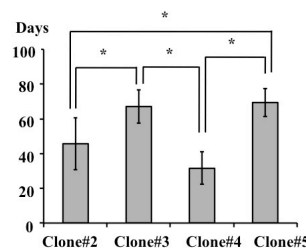
我々は EGF-EGFR が脳腫瘍幹細胞の自己複製能において重要な役割をもち、低酸素条件下における低酸素誘導因子 HIF1-alpha の発現においても同様であることを発表してきた。本研究においては異なる phenotype を示すこれらのクローンの薬剤反応性を検討した。

4. 研究成果

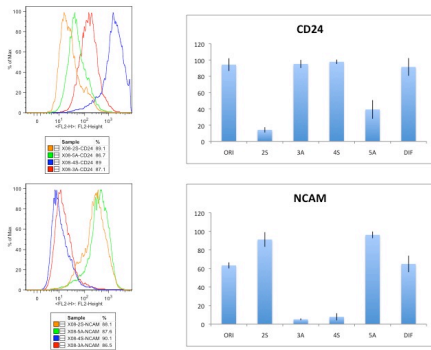
<各クローンは細胞増殖能に差がみられた>EGF/FGF を用いた浮遊培養条件にも関わらずクローンは従来通り浮遊する細胞群と、コーティング剤を用いないにもかかわらず接着し増殖する群がみられた。これらは細胞増殖能にも差が有り浮遊する細胞群(#2, #4)が接着する細胞群(#3, #5)より増殖能が高かった(下図)。



更にこれらをマウスに移植したところ増殖能に一致した腫瘍形成能がみられた。

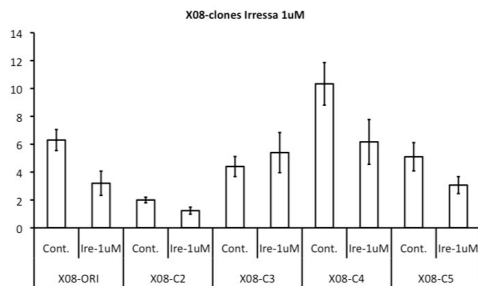


これらのクローンの表面マーカーを FACS にて解析したところ CD24, NCAM に規則的な差異がみられたが、細胞形態、増殖能、腫瘍形成能とは一致しなかった。これにより、本悪性脳腫瘍患者には少なくとも 4 種類のがん幹細胞が存在すると思われた。



cDNA array 解析を行ったところ、Collagen1A1, IGFBP7 が細胞形態、増殖能、腫瘍形成能とは一致した。二者は脳腫瘍の階層と多様性になんらかの重要な役割が有る可能性があり、今後の検討課題となった。

我々が既報の手段で EGFR 阻害剤を用いた薬剤感受性テストをおこなったところ#3 に抵抗性がみられたが、そのメカニズムに関しては結論に至っていない。引き続き研究を進めて行く予定である。



以上の成果を米国癌学会に招かれた際の結語をもちいて総括する。

- ・4 different glioma stem cell clones from a single cell were isolated from a patient.
- ・3 genes might play an important role of their morphology and tumorigenesis.
- ・Cell surface markers (CD24, NCAM, CXCR4) and surface EGFR vary in tumorigenesis.
- ・Different therapeutic responses and activating pathways may explain GBM recurrences.
- ・The data support that GBMs contain heterogenous stem cell-like cells.
- ・Heterogeneity and hierarchy are fundamental question of oncology.

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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Soeda A (Minisymposium): Cancer stem cell dynamics and heterogeneity. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013. Washington, DC, 2013. 4. 6-10
- ② 副田明男, 原 明, 矢野大仁, 大江直行, 中山則之, 岩間 亨: 悪性脳腫瘍を構成する多様な脳腫瘍幹細胞. 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会. 広島, 2012. 11. 25-27
- ③ Soeda A, Hara A, Park D, Iwama T: Heterogenous glioma stem cells form a patient. The 17th annual scientific meeting and education day of the society for neuro-oncology. Washington DC, 2012.11.15-18
- ④ Hitomi M, Gallagher J, Gadani S, Li M, Adkins J, Vsanji A, Wu Q, Soeda A, McLendon R: Inheritance depicts asymmetric cell division and the generation of tumor heterogeneity. The 17th annual scientific meeting and education day of the society for neuro-oncology. Washington DC, 2012.11.15-18
- ⑤ 副田明男, 原 明, 矢野大仁, 大江直行, 中山則之, 岩間 亨: 悪性脳腫瘍の多様性を理解する. 第 71 回日本脳神経外科学会学術総会. 大阪, 2012. 10. 17-19
- ⑥ 副田明男, 原 明, 岩間 亨: 脳腫瘍幹細胞の多様性. 第 13 回日本分子脳神経外科学会. 熊本, 2012. 9. 20-21
- ⑦ Soeda A: Molecular pathways regulating glioma stem cells. International society for stem cell research 10th annual meeting. Yokohama, 2012. 6. 13-16
- ⑧ 副田明男, 原 明, 矢野大仁, 大江直行, 中山則之, 岩間 亨: がん幹細胞が脳腫瘍病理へ与えたインパクト—一人の患者から得た single cell 由来細胞株の病理学的検討—. 第 30 回日本脳腫瘍病理学会. 名古屋, 2012. 5. 24-26

[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://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

副田 明男 (SOEDA, Akio)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20444276

(2) 研究分担者

矢野 大仁 (YANO, Hirohito)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00332685

大江 直行 (OHE, Naoyuki)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60362159

田中 嘉隆 (TANAKA, Yoshitaka)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00402199

(3) 連携研究者

()

研究者番号：