

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700986

研究課題名(和文) グリオブラストーマの腫瘍形成規定因子の同定

研究課題名(英文) Identification of key factors of glioblastoma tumorigenesis

研究代表者

サンペトラ オルテア (Sampetean, Oltea)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50571113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：グリオブラストーマ起源細胞の特性を解析し、腫瘍塊形成を規定する因子の同定を目標として研究を行った。具体的には：(1)グリオブラストーマのマウスモデルを用いて、複数の腫瘍起源細胞のクローンを樹立し、その増殖能、浸潤能などのフェノタイプ解析を行った。その結果、腫瘍起源細胞の代謝特性がクローンによって大きく異なることを見出した。(2)樹立した腫瘍起源細胞の遺伝子プロファイルを解析し、(1)で同定した性質の規定因子候補を同定した。(3)同定した特性・規定因子の機能解析を行い、グリオブラストーマ起源細胞がエネルギー代謝経路として解糖経路のみならず、酸化的リン酸化経路も使用できることを証明した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to investigate the characteristics of glioma-initiating cells (GICs) and identify key factors regulating the formation of glioblastoma. Using our syngeneic murine model, we conducted research as follows.

(1) We established several GIC clones and analyzed their basic properties, such as proliferation, invasion and ability to induce microvascular proliferation. As a result, we found that metabolic characteristics such as glucose consumption and lactic acid production can differ significantly between clones. (2) We analyzed the gene expression profile of our GIC clones and identified factors involved in the regulation of their metabolic characteristics. (3) We performed a functional analysis of the data obtained in (1), (2) and showed that GICs can use not only glycolysis, but also oxidative phosphorylation during glioblastoma formation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：癌 遺伝子 細胞・組織

### 1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマ(以後 GBM)は平均生存期間が15か月に満たず、その治療成績が向上しない原因の一つは生物学的な不均一性・多様性にあると考えられる。診断時のGBMはすでに多くの遺伝子/経路異常を呈しており、完成し複雑化した腫瘍組織から治療の標的を一つの分子/遺伝子異常/細胞に絞ることは困難である。また、発癌イベントが生じてから腫瘍塊形成に至るまでのプロセスも臨床症例では解析不可能であるため、腫瘍形成に必要な因子とそれが誘導されるメカニズムが十分解明されていない。もしそのプロセスとメカニズムが明らかになれば早期診断・早期治療が可能となり、治療成績向上につながると考えられる。本研究では、独自に樹立したグリオブラストーマのマウスモデルを用いて、その腫瘍形成能の分子背景を詳細に解析した。これまでの研究ですでに腫瘍形成能の異なる複数の起源細胞(GBM initiating cells: GICs)を樹立しており、それらの細胞の特性を解析することで、グリオブラストーマにおける腫瘍形成能を規定する因子の同定を目指した。

### 2. 研究の目的

少数の起源細胞から始まり、腫瘍塊形成に至るまでの過程に着目し、GBMの起源細胞(GBM initiating cell; GIC)の特性を解析し、腫瘍塊形成能を規定する因子の同定を目標として研究を行った。具体的には:

(1) GICのフェノタイプ解析: GBMの基本的な性質(増殖能、接着能、浸潤能、血管新生など)について、GIC間の違いを調べ、GICの悪性度などの特性を調べる。

(2) 腫瘍形成において重要な遺伝子の探索: 樹立している複数のGICの遺伝子プロファイルを解析し、上記(1)で同定したフェノタイプの規定因子を同定する。

(3) 同定した特性・規定因子の解析: 同定した因子について機能解析を行い、その生物学的な重要性、GBM腫瘍形成における役割を評価・確認し、重要な因子をさらに絞り込む。

### 3. 研究の方法

#### (1) GICのフェノタイプ解析:

樹立しているGICのクローンの増殖能は細胞数カウント、自己複製能はスフェア形成能より算出した。

微小環境を酸性化する能力を培地のpHの変動にて評価した。

それぞれのクローンをマウスの前脳に移植して、形成した腫瘍の病理組織解析より浸潤能を評価した。腫瘍塊より離れて、正常脳に浸潤した腫瘍細胞の数、距離をGFP免疫染色にて定量化した。

上記病理組織切片のCD31及びvon Willebrand factorの組織染色を行い、陽性細胞の数の定量化にて血管内皮細胞及び血管新生を評価した。

#### (2) 腫瘍形成において重要な遺伝子の探索:

*Ink4/Arf* KO神経幹細胞、*Ink4/Arf* KO神経幹細胞に*dsRed*と*HRasV12*を強制発現させたGIC、GIC各クローンからRNAを抽出し、マイクロアレイ用のサンプルを調整した。マイクロアレイにはAffimetrixのGeneChipを用いて、解析はGene Set Enrichment Analysisにて行った。

#### (3) 同定した特性・規定因子の解析:(1)

(2)の解析の結果、クローンの代謝特性に違いが認められたため、解糖系代謝経路の関連酵素の発現をPCR、ウェスタン・ブロットにて確認した。また、CE-TOMFSにて細胞内代謝産物の解析を行い、Seahorse metabolic flux analyzerを用いて細胞外代謝産物を測定した。さらに、各GICクローンから形成された腫瘍について、免疫染色にて同定した関連因子の発現を調べた。

### 4. 研究成果

(1) GICのフェノタイプ解析: GICクローンの増殖能、自己複製能、腫瘍形成能には差が認められなかった(図1)。また、今回の解析では、浸潤能、血管新生能にも明らかな差が認められなかった。

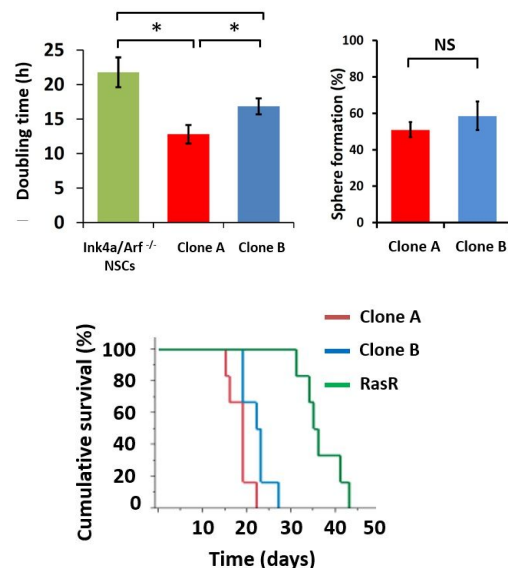


図1. GICの増殖能、スフェア形成能、腫瘍形成能 (Saga I et al, *Neuro-Oncology*, in press より引用)

一方、クローンの乳酸産生能、糖消費量には差が認められ、異なるエネルギー代謝経路を利用していることが示唆された。

(2) 腫瘍形成能において重要な遺伝子の探索：マイクロアレイ及び GSEA 解析の結果、クローン A とクローン B 間では、酸化リン酸化及び解糖系関連遺伝子に有意差が認められた。浮かび上がった因子についてタンパクレベルでの発現の差も確認された(図2)。

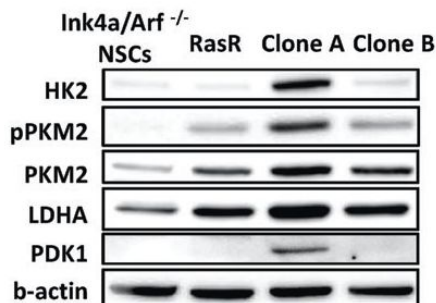


図2：GICにおける解糖経路関連酵素の発現 (Saga I et al, *Neuro-Oncology*, in press より引用)

(3) 同定した特性・規定因子の解析：上記の結果から GIC に代謝経路が異なる細胞が存在すると示唆されたため、二つのクローンについて細胞内・外代謝産物の解析を行った。メタボローム解析により、正常の神経幹細胞に癌遺伝子を導入し、悪性転換をさせることによって、細胞内代謝産物の含量も大きく変動することが確認された。さらに、クローン A では解糖系代謝経路の中間産物が多く含まれていることが確認された。また、細胞外代謝産物の解析により、クローン B は正常状態では酸素消費が高く、主に酸化リン酸化を使用していることが判明した(図3)。

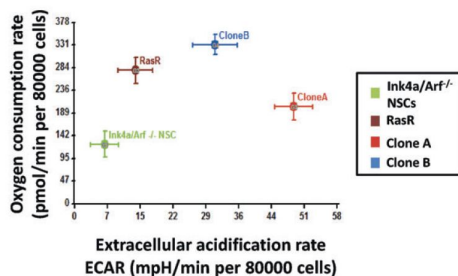


図3：GICの酸素消費能、微小環境の酸性化率 (Saga I et al, *Neuro-Oncology*, in press より引用)

GIC クローンの上記の特性は腫瘍形成能には明らかな影響を及ぼさなかった(図1)が、形成された腫瘍ではGICの特性が保たれていたことが判明した(図4)。

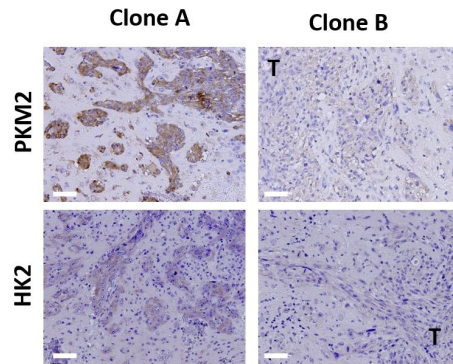


図4：GICクローンより形成されたマウス脳内GBMにおける代謝関連因子の発現 (Saga I et al, *Neuro-Oncology*, in press より引用)

上記の結果より、同じ遺伝子異常を背景に持つGICには、性質の異なる分画が存在することが示唆された。さらに、GICはエネルギー代謝経路として好氣的解糖経路のみならず、酸化リン酸化経路も使用できる可能性も示唆され、神経膠芽腫の新しい治療戦略を構築する際にGICのエネルギー代謝の多様性を考慮する必要があると考えられた。

#### 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2件)

Saga I, Shibao S, Okubo J, Osuka S, Kobayashi Y, Yamada S, Fujita S, Urakami K, Kusuhara M, Yoshida K, Saya H, Sampetean O. Integrated analysis identifies different metabolic signatures for tumor-initiating cells in a murine glioblastoma model. *Neuro-Oncology*, 2014, in press, 査読あり

Sampetean O and Saya H: Characteristics of glioma stem cells. *Brain Tumor Pathol* 2013, 30(4):209-14. doi: 10.1007/s10014-013-0141-5 査読あり

[学会発表](計3件)

1) Sampetean O: Integrated analysis identifies different metabolic signatures for tumor-initiating cells in a murine glioblastoma model, Keystone Symposia - x5 Tumor Metabolism, Whistler, Canada, March 19, 2014

2) Sampetean O: Anti-invasion strategies in an induced cancer stem cell model of glioblastoma, 19th International Brain

Tumor Research and Therapy Conference,  
Niagara Falls, Canada, June 23, 2012

3) Sampet rean 0: Invasion characteristics  
of tumor cells in a glioblastoma model of  
genetically modified neural stem cells,  
103 Annual Meeting of American Association  
for Cancer Research, Chicago, USA, April  
3, 2012,

〔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〕

<http://genereg.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

サンペトラ オルテア(Sampet rean Ol tea)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50571113