

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460488

研究課題名(和文)トランスポゾン誘導型膠芽腫モデルを用いたLgr5+細胞の特性と新規治療標的の解明

研究課題名(英文)Characterization of Lgr5+ cells using a transposon-induced glioblastoma mouse model and identification of novel therapeutic targets

研究代表者

中田 晋(Nakata, Susumu)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80590695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：LGR5-EGFPトランスジェニックマウスに対してSleeping Beautyトランスポゾン誘導型膠芽腫発癌マウスモデルを作成した。作成した腫瘍から神経幹細胞培養維持モデルであるスフェロイド培養系を多数樹立した。GFPシグナル陽性細胞を選択的に分離したところ、Lgr5の高発現を確認した。Lgr5陽性細胞は高い生体内腫瘍形成能を示し、癌幹細胞の特性を強く保持していると考えられた。網羅的発現解析により、GFP陽性細胞においてshhパスウェイが活性化していること、逆に陰性細胞ではCDKN因子が高いことを明らかにした。さらにGli2がスフェロイド細胞に必須の因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The Sleeping Beauty transposon-induced glioblastoma model was successfully introduced in the Lgr5-eGFP transgenic mouse. Precise collections of the mouse glioblastoma tissues were feasible. Several lines of neurosphere culture using a neural stem cell culture system derived from the mouse glioblastoma tissues were established. Higher Lgr5 expression levels in the GFP positive fraction were confirmed. The observations that the Lgr5 positive cells exerted higher tumorigenicity in vivo indicated that the cancer stem cell properties were enriched in the Lgr5 positive glioblastoma cells. Global gene expression analysis was performed, which identified the shh-pathway as a signal activated in the Lgr5 positive population and higher expression of CDKNs in Lgr5 negative population. Furthermore, Gli2 was identified as an indispensable factor for the glioblastoma stem cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 脳腫瘍 膠芽腫 Lgr5 Wnt Shh

1. 研究開始当初の背景

成人に最も多い脳腫瘍である膠芽腫は極めて予後不良な疾患であり、このような難治性癌は現在においても深刻な問題として取り残されている。近年、癌細胞は不均一な細胞で成り立ち、中でもより未分化な幹細胞に似た癌細胞 (癌幹細胞) の存在が知られるようになった。しかし、癌幹細胞の全容については、いまだ未解明な点が多い。代表者は、膠芽腫幹細胞の維持に Wnt シグナル下流因子である組織幹細胞マーカー遺伝子 LGR5 の発現が必須であること、また腫瘍組織における LGR5 蛋白発現量と膠芽腫症例の全生存率が有意に相関することを世界に先駆けて見いだした。さらに、LGR5 下流でかつ細胞死誘導に伴って発現低下する遺伝子群の網羅的探索を行ってきた。しかしながら、生体内膠芽腫組織中における LGR5 の発現の意義や陽性細胞の生物学的特性については不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LGR5 発現膠芽腫細胞の生体内腫瘍において果たす役割を明らかにすることである。特に、癌幹細胞が保持する特性と考えられている、正常幹細胞と類似した幹細胞特有の遺伝子発現様式、足場非依存的で血清を含まない培地中で細胞集塊を形成しながら増殖するスフェロイド形成能、生体内組織中で新たな腫瘍を形成する腫瘍形成能に代表される、癌幹細胞特性に着目し LGR5 陽性細胞の生物学的振る舞いを明らかにする。さらに、これらの解析から見いだした遺伝子群の中で、癌幹細胞に必須の遺伝子群を明らかにし、癌幹細胞特性解析に立脚した新規治療標的分子を明らかにすることを目的とした。

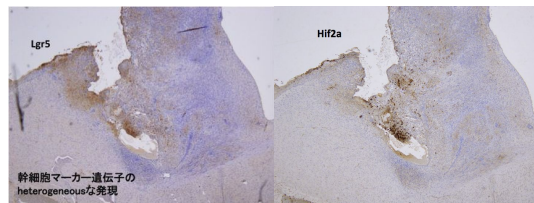
3. 研究の方法

LGR5 遺伝子プロモーターの制御下に全身の細胞で EGFP を発現するノックイントランスジェニックマウスの新生仔の脳室内に、デジタル制御高精度ステレオタキシクフレームを用いて、Sleeping Beauty トランスポゾンシステム搭載した EGFRvIII、NRas、shTP53 癌原遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターをインジェクションした。この技術により作成した膠芽腫組織を、ルシフェラーゼシグナルを指標として正確に摘出・トリミングし、物理的分離と酵素的消化を組み合わせ細胞レベルまで dissociation し、膠芽腫細胞を生きたまま取得した。この細胞群から、正常神経幹細胞の維持培養システムである、EGF および bFGF を含む無血清培地と無コーティング低接着デッシュを用いたスフェロイド培養系株と、同時に平行して通常の 10% 血清を含む接着培養系分化培養細胞株を、多数の腫瘍組織由来のラインを樹立した。これらの細胞を用いて遺伝子発現解析を行った。さらに、この膠芽腫幹細胞培養系から

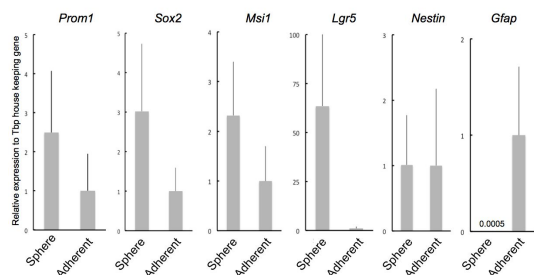
GFP 発現を指標とした LGR5 陽性細胞を生きた状態で分取した。次いで 定量的スフェロイド形成アッセイ、cDNA マイクロアレイ解析を用いた網羅的遺伝子発現解析、成体マウスを用いた大脳実質内への同所性移植モデルをもちいた生体内腫瘍形成能の定量的評価を行った。さらに、これのアッセイにより見いだされた新規治療標的候補遺伝子群に対する、shRNA 発現レンチウイルスベクターを構築し、ノックダウンによる機能解析を行った。

4. 研究成果

作成したマウス膠芽腫の腫瘍組織中における Lgr5 遺伝子の発現を免疫組織化学的に解析したところ、ヒト臨床検体と類似したヘテロな発現パターンを示した。Lgr5 陽性細胞は主に pseudopalisading を伴うマイクロネクロシス周辺および増生した腫瘍血管の豊富な領域に局在した。さらに、pimonidazole を用いた生化学的な低酸素の検出と Hif 蛋白検出を併用し、腫瘍中の低酸素領域と各幹細胞マーカー遺伝子発現との関連性を検討した結果、Hif2a と LGR5 を発現する細胞が共存を示した。



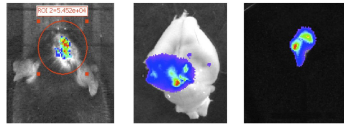
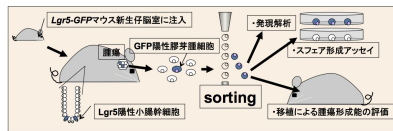
マウス膠芽腫組織を摘出し、スフェロイド培養系を樹立したところ、接着系培養で維持した膠芽腫細胞と比較して、Lgr5 の高い発現がみられた。この際に CD133 のマウスホモログである Prominin-1 を始めとする各種幹細胞マーカー遺伝子群もスフェロイド培養系でより高い発現が確認された。



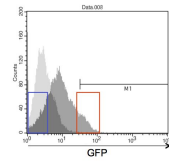
p53-shRNA、NRas および EGFRvIII の導入による、sleeping beauty トランスポゾン誘導型マウス膠芽腫モデルから樹立したスフェロイド培養系においても、他の幹細胞マーカーとともに Lgr5 が高発現し、100 細胞から 1,000 細胞の同所性移植で同系統マウスへの腫瘍形成がみられた。Lgr5 プロモーター制御下に GFP を発現するトランスジェニックマウスに対して、この sleeping beauty 腫瘍モデル作製し、GFP を指標に Lgr5 陽性細胞

胞を分離し、100 細胞を用いて同系統マウス
の大脳皮質への同所性移植モデルを作成し
腫瘍形成能を比較したところ、陰性細胞に
比べて Lgr5 陽性細胞はより高い腫瘍形成能
を示した。

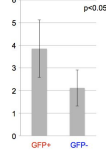
Lgr5-GFPマウスに対する膠芽腫モデル



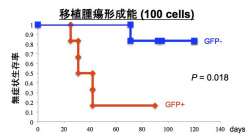
GFP発現を指標とした細胞分離



spheroid形成能

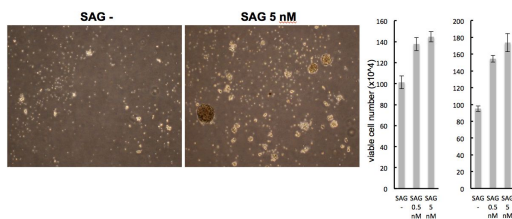


移植腫瘍形成率	n	%
GFP+ 100cells	5/6	83.3%
GFP- 100cells	1/6	16.7%



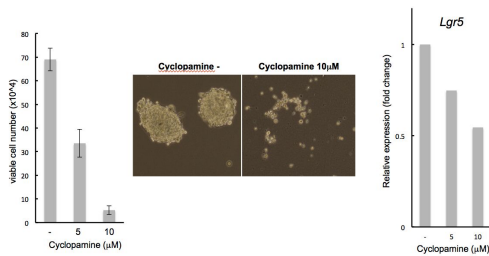
膠芽腫の癌幹細胞を効率よく阻害するための
新規治療標的を明らかにすることを目指し、
網羅的遺伝子発現解析を用いて Lgr5 陽性
細胞に特徴的に活性化しているシグナル因
子の探索を行った。パスウェイ解析の結果、
Lgr5 陽性細胞において、ソニックヘッジホ
ッグシグナルの活性化がみられた。そのため、
ソニックヘッジホッグシグナルを活性化す
ることが知られている、smoothened のアゴ
ニストを用いてスフェロイド培養系の細胞を
刺激すると、スフェロイド形成の亢進と Lgr5
発現の亢進がみられた。

Shh経路の活性化は、膠芽腫幹細胞のスフェロイド形成を促進する



また、逆に smoothened のアンタゴニストで
ある cyclopamine を用いてソニックヘッジホ
ッグシグナルを阻害すると、マウス膠芽腫由
来スフェロイド培養系の顕著な増殖抑制と
Lgr5 発現の低下がみられた。

Shh経路の阻害は、膠芽腫幹細胞の増殖を阻害しLgr5発現を減少させる



さらに、ソニックヘッジホッグシグナルの亢
進に中心的役割を果していると考えられた、
Gli 転写因子に着目し、これらに対する shRNA
を発現するレンチウイルスベクターを構築し、
ノックダウンを行った結果、スフェロイド
細胞の顕著な増殖抑制と、Annexin V の陽
性化を伴うアポトーシス誘導がみられた。

これらの結果は、Lgr5 陽性細胞が低酸素ニ
ッチに局在すること、Lgr5 陽性マウス膠芽
腫細胞が、各種の幹細胞マーカーを高発現し、
高い腫瘍形成能を保持する癌幹細胞として
の特性を保持すること、この細胞分画をド
ライブするシグナルとして、ソニックヘッジ
ホッグシグナルの活性化が寄与しているこ
とを示唆している。現在これらの結果をまと
め、投稿準備中である。

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 7 件)

1. Fujita M, Shintai K, Nakata S, Maeda N,
Hatano N, Seki Y. Intimo-intimal
intussusception: a rare form of common
carotid artery dissection. J Vasc
Interv Radiol. 26:1414-6 (2015)

2. Nakata S, Tanaka H, Hara M, Ito Y, Fujita
M, Kondo E, Kanemitsu Y, Yatabe Y,
Nakanishi H. Deficient HER3 expression in
poorly-differentiated colorectal cancer
cells enhances gefitinib sensitivity. Int
J Oncol. 45:1583-1593 (2014)

3. Nakata S, Phillips E, Goidts V. Emerging
role for leucine-rich repeat-containing
G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4
in cancer stem cells. Cancer Management
and Research, 6:171-180 (2014)

4. Koike H, Ouchi R, Ueno Y, Nakata S, Obana
Y, Sekine K, Zheng Y, Takebe T, Isono K,
Koseki H, Taniguchi H. Polycomb Group
Protein Ezh2 Regulates Hepatic Progenitor
Cell Proliferation and Differentiation in
Murine Embryonic Liver. PLoS One,
9(8):e104776 (2014)

5. Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Nakata S, Ouchi R, Obana Y, Sekine K, Zheng Y, Takebe T, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. Ring1B Promotes Hepatic Stem/Progenitor Cell Expansion via Simultaneous Suppression of Cdkn1a and Cdkn2a. *Hepatology*, 60: 323-333 (2014)

6. Ruma IM, Putranto EW, Kondo E, Watanabe R, Saito K, Inoue Y, Yamamoto K, Nakata S, Kaihata M, Murata H, Sakaguchi M. Extract of *Cordyceps militaris* inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth of human malignant melanoma cells. *Int J Oncol*. 45:209-18 (2014)

7. Nakata S, Campos B, Bageritz J, Lorenzo Bermejo J, Becker N, Engel F, Acker T, Momma S, Herold-Mende C, Lichter P, Radlwimmer B, Goidts V. LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain Pathology*, 23:60-72 (2013)

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 三宅美月, 塚本めぐみ, 佐竹一紘, 中田晋, 石川智久, 中川大: ヒト ABCG4 はヒト ABCG2 とは異なるタイプの薬物輸送体である. 日本薬学会第 135 年会(神戸), 2015.3.

2. 三宅美月, 塚本めぐみ, 佐竹一紘, 中田晋, 石川智久, 中川大: 細胞の薬剤感受性を起点にしたヒト ABCG4 の機能解析 - ヒト ABCB1 およびヒト ABCG2 との比較 -. 第 10 回トランスポート研究会年会(東京), 2015.6.

3. 三宅美月, 塚本めぐみ, 佐竹一紘, 中田晋, 石川智久, 中川大: ヒト ABCG4 はヒト ABCG2 とは異なるタイプの薬物輸送体である. 第 28 回日本動物細胞工学会 2015 年度大会 (JAACT2015) (仙台), 2015.7.

4. Mitsugu Fujita, Takeshi Okuda, Susumu Nakata, Yoshihiro Komohara, Amami Kato, Osamu Yoshie: B7-H3 and B7-H5 in tumor-associated M2 macrophages correlate with brain metastasis formation of lung cancer. *International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages*(東京), 2015.7.

5. 飯居宏美, 谷口恵香, 中田晋, 吉貴達寛: 新規 γ -glutamylcyclotransferase (GGCT) 阻害剤の探索とその膜透過型プロドラッグ開発. 第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋), 2015.10.

6. 三宅美月, 塚本めぐみ, 佐竹一紘, 中田晋, 石川智久, 中川大: ヒト ABCG4 は、新しいタイプの薬物輸送体である. 第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋), 2015.10.

7. 藤田真, 奥田武司, 中田晋, 菰原義弘, 加藤天美, 義江修: 腫瘍内 M2 マクロファージにおける B7-H3 および B7-H5 発現量は肺癌原発転移性脳腫瘍の発症と相関する. 第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋), 2015.10.

8. 佐原真美, 澤野友紀, 飯居宏美, 中田晋, 吉貴達寛: γ -Glutamyl cyclotransferase 阻害によるアポトーシス非依存的細胞増殖抑制. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会(大阪), 2015.10.

9. 塩見紗英子, 飯居宏美, 中田晋, 吉貴達寛: 乳がん細胞株 MCF-7 細胞における γ -glutamyl cyclotransferase 阻害によるオートファジー誘導の検討. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会(大阪), 2015.10.

10. Mitsuki Miyake, Megumi Tsukamoto, Kazuhiro Satake, Susumu Nakata, Tomohisa Ishikawa, Hajime Nakagawa: Human ABC transporter ABCG4 is a novel type of drug transporter. *TOIN International Symposium on Biomedical Engineering 2015*(横浜), 2015.11.

11. Mitsugu Fujita, Hiromasa Yoshioka, Takeshi Okuda, Susumu Nakata, Shin-ichi Miyatake, Amami Kato, Osamu Yoshie: Inhibition of ABCG2 enhances chemo-sensitivity of murine glioma stem cell-like cells and reduces chemokine-mediated tumorigenicity. 第 44 回日本免疫学会学術集会(札幌), 2015.11.

12. 田崎貴之, 藤田真, 奥田武司, 中田晋, 吉岡宏真, 加藤天美: 悪性神経膠腫における MET 遺伝子発現の臨床的意義. 第 19 回バイオ治療法研究会学術集会(東京), 2015.12.

13. 中田晋, 伊藤友一, 金光幸秀, 近藤英作, 中西速夫: 低分化型大腸癌細胞の HER3 低発現は gefitinib 感受性に影響を与える. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜), 2014 年 9 月 27 日.

14. 塚本めぐみ, 佐竹一紘, 田島靖浩, 中田晋, 石川智久, 中川大: ヒト ABCG2 が細胞に賦与するタキサン系抗がん剤耐性は、ABCG2 遺伝子上に存在する非同義一塩基多型によって異なる. 第 134 回日本薬学会年会(熊本), 2014 年 3 月 28 日.

15. 中田晋, 上野康晴, 小池博之, 関根圭

輔, 谷口英樹 Localization of repressive histone marks and target genes dynamically switch through murine hepatic differentiation 第 72 回 日本癌学会学術総会(横浜), 2013 年 10 月 4 日.

16. 藤田 貢, 中田 晋, 加藤天美, 義江修 COX-2 blockade immunologically suppresses brain metastasis of lung cancer 第 72 回 日本癌学会学術総会(横浜), 2013 年 10 月 4 日.

17. 星野早百合, 関根圭輔, 孫略, 中田 晋, 寺崎哲也, 森永聡一郎, 宮城洋平, 遠藤格, 横瀬智之, 上野康晴, 倉田昌直, 谷口英樹 Analysis of chemoradiotherapy resistance in the human pancreatic cancer stem cells 第 72 回 日本癌学会学術総会(横浜), 2013 年 10 月 4 日.

〔図書〕(計 1 件)

1. Nakata S, Phillips E, Goidts V. LGR5 as a marker of in brain cancer. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications. Preedy VR, Patel VB, editors, Springer Netherlands: pp361-378, 2015.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 晋 (NAKATA, Susumu)
京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 准教授
研究者番号: 8 0 5 9 0 6 9 5

(2) 研究分担者

藤田 貢 (FUJITA, Mitsugu)

近畿大学医学部 細菌学教室 准教授
研究者番号: 4 0 6 0 9 9 9 7

(3) 連携研究者

()

研究者番号: