

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591708

研究課題名（和文） 神経膠芽腫腫瘍幹細胞における遺伝子異常の時間的・空間的解析

研究課題名（英文） Genetic analysis of glioblastoma cancer stem cell with special reference to chronological and spatial change

研究代表者

林 裕 (HAYASHI YUTAKA)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90262568

研究成果の概要（和文）：神経膠芽腫の発生・悪性化における時間的・空間的特質を解析するために腫瘍幹細胞における特定因子の解析を行った。幹細胞マーカーである CD133 を用い陽性細胞の分離、培養に成功した。それらを用い空間的特質である浸潤能に関与する integrin family の発現形式を検討した。その結果 4 種類の α subunit の中で $\alpha 3$ subunit が有意に高い発現を示し、腫瘍浸潤能への関与が示唆された。また、神経膠芽腫の時間的特質である悪性化の過程でアポトーシスや幹細胞調節に関係する FAS 遺伝子と TP53 遺伝子の変異の関与が疑われた。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the specific factors in tumorigenesis of the glioblastoma, especially in chronological and spatial character, several genes expressions and mutations were analyzed. Among the integrins that could be related with invasion, the alpha 3 subunit had a significantly higher expression level in tumor stem cells. The alpha 3 subunit of integrin could play an important role in the tumor invasion. Furthermore, during a course of tumor progression, FAS and TP53 mutation were detected. These genetic alterations could be related with tumor progression with a malignant transformation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：脳腫瘍学

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：脳腫瘍、神経膠芽腫、腫瘍幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性脳腫瘍、特に神経膠芽腫の治療成績はここ半世紀目立った向上は見られていない。手術療法、化学療法、およ

び放射線治療による集学的治療を行っても平均生存期間は2年を切っている。治療成績がそれほど向上していない反面、腫瘍の生物学的特性に関しては20世紀後半

からの分子生物学的研究の発展に伴い、様々な知見が集積されてきている。我々も癌遺伝子や抑制癌遺伝子が、どのような変異を有し、どのように腫瘍に関与しているかについては1990年初頭より数多くの新知見を発表してきた。しかし、神経膠芽腫が個々の患者において、時間的、空間的に、何時、どのように発生するかに関しては、その形態学的変化も含めて、いまだにこれらの遺伝子群との相関関係を見出せないでいる。この点に関して我々は、脳深部に発生する神経膠芽腫と他の部位に発生する神経膠芽腫におけるTP53遺伝子変異の相違が、脳室周囲に存在する神経幹細胞と何らかの関連性も持つ可能性を見出した(Cancer Genet & Cytogenet (2004))。

(2) 一方近年、神経膠芽腫における腫瘍幹細胞の存在が示されてきている。腫瘍幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、神経幹細胞と極めて近い性質を持っている。しかし、神経膠芽腫腫瘍幹細胞において他の腫瘍細胞や神経幹細胞には認められないような特徴的な遺伝子変化や特定の因子の関与などが存在するかどうか、に関しては現時点では全く不明である。

2. 研究の目的

(1) 上述した背景を踏まえて、本研究においては、我々が発見してきた各遺伝子群の異常や特定因子の活性や発現異常が神経膠芽腫における腫瘍幹細胞において、どのように関与しているかと検討する。また、腫瘍幹細胞における各種特定因子の活性や発現異常が神経膠芽腫の発生における時間的・空間的な特質にどのように関与するかを検討する。

(2) 本腫瘍に特徴的な腫瘍幹細胞に

おける生物学的特性を解明することは、将来的に、その特性に基づいた治療に利用することが可能であり、神経膠芽腫の腫瘍幹細胞をターゲットとした有効な治療法の開発につながると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍幹細胞の分離抽出および長期培養

神経膠腫における腫瘍幹細胞の特徴を明らかにするため、神経膠腫から腫瘍幹細胞を同定単離し、長期培養系を確立することを試みた。14例の神経膠腫(びまん性星状細胞腫 1例、退形成性星細胞腫 2例、神経膠芽腫 11例)の手術検体と4種類のグリオーマ細胞株(U87, U251, T98G, SNB19)を用いて auto MACS Pro Separator により CD133 陽性細胞を分離抽出し、neurosphere の形成と長期培養を試みた(図1)。

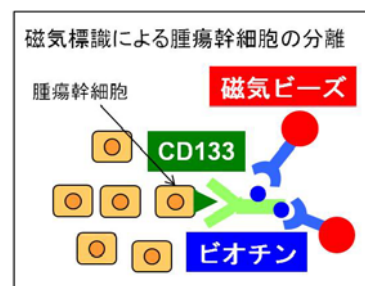


図1

(2) 腫瘍幹細胞内における特定因子が腫瘍の空間的特徴に与える影響の検討

神経膠芽腫における時間的・空間的特徴のひとつである腫瘍浸潤能に着目し、腫瘍浸潤能に関与する細胞外基質受容体蛋白の integrin family の腫瘍幹細胞内での発現形式を解析し、浸潤能に与える影響を検討した。

① 4種類のグリオーマ細胞株(U87, U251, T98G および SNB19) と2例の手術により抽出した神経膠芽腫から同定・抽出した CD133 陽性腫瘍幹細胞と CD133 陰性の非腫瘍幹細胞を用いた。これらの腫瘍幹細胞および非幹細胞

群において、4種類の integrin family、 α subunit、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ および αV の mRNA の発現形式を real-time RT-PCR 法を用い検討した。

② 腫瘍幹細胞における関与が疑われた integrin family の subunit の発現をコントロールすることにより、実際の腫瘍細胞の浸潤能が影響を受けるかどうかを検討した。グリオーマ細胞株 U87 を用い、特定の integrin family α subunit を強制発現させる系と発現を抑制させる系を作成、それぞれの腫瘍細胞における浸潤能を matrigel invasion assay により検討した。

(3) 腫瘍細胞における特定因子が腫瘍の時間的特徴に与える影響の検討

神経膠芽腫の発生過程において、前駆的な良性病変から長期的経過を経て神経膠芽腫に変化する2次的神経膠芽腫の存在が知られている。我々はそのような特徴的な症例を選出し、その発生過程における遺伝子異常を検討した。今回我々は約14年の経過を経て、良性の毛様細胞性星細胞腫 (pilocytic astrocytoma) から近接する部位に悪性神経膠腫が発生した症例のそれぞれの病変より腫瘍細胞を摘出し、その腫瘍細胞における EGFR 遺伝子、P53 遺伝子、FAS 遺伝子、BRAF 遺伝子および IDH1 遺伝子の異常を解析した (図2)。

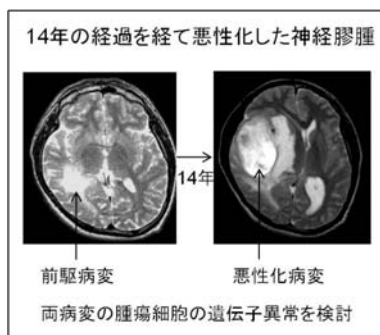


図2

4. 研究成果

(1) 神経膠芽腫からの腫瘍幹細胞の培養系

の確立

悪性度の低い腫瘍では腫瘍幹細胞の培養は困難であったが、神経膠芽腫 2 例において spheroid の形成を認め (図3)、1 例において3カ月を超える長期培養に成功した。また4種類の腫瘍細胞株のうち U87 および T98G において spheroid の形成を認めた。このことより悪性度の高い神経膠芽腫においては CD133 陽性細胞の比率が高く、磁気分離法により腫瘍幹細胞の培養系を作成することが可能であることが判明した。これらの培養系腫瘍幹細胞は今後の腫瘍幹細胞研究に有用であると考えられた。

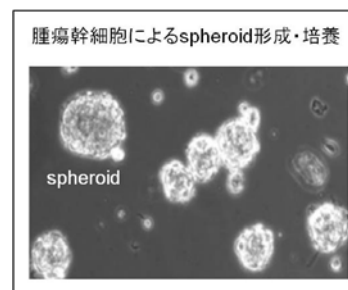


図3

(2) (1)において確立された腫瘍幹細胞培養系を用い、以下の成果を得た。

① 腫瘍浸潤能に関与とすると考えられる integrin family α subunit のうち、 $\alpha 3$ subunit の発現が腫瘍幹細胞において、非腫瘍幹細胞と比較し有意に高いことが示された (図4)。このことより神経膠芽腫の空間的発育の特徴である腫瘍細胞の浸潤能に、腫瘍幹細胞における integrin $\alpha 3$ subunit の関与が示唆された。

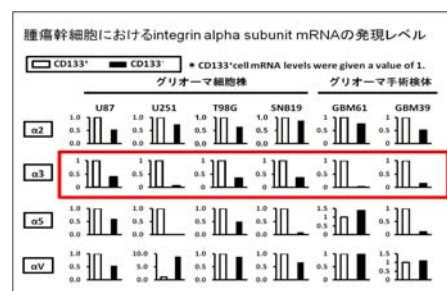


図4

② グリオーマ培養細胞 U87 を用い、integrin $\alpha 3$ subunit を強制発現させた系と発現を抑制した系を作成し、実際の浸潤能を検討した結果、強制発現したものでは明らかに浸潤能が亢進した (図 5)。それに対して、発現を抑制したものでは、逆に浸潤能の低下を認めた (図 6)。このことより integrin $\alpha 3$ subunit の腫瘍浸潤能に対する機能的関与が裏付けられた。

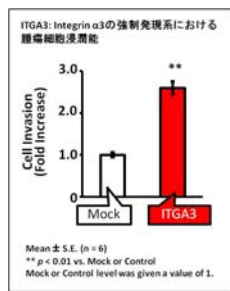


図5

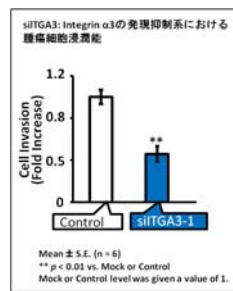


図6

以上より、神経膠芽腫においては、その空間的特徴に關与する浸潤能に integrin $\alpha 3$ subunit の關与が考えられ、この關与は腫瘍幹細胞の段階においてすでに認められる。我々が得た結果は、将来的には本因子をターゲットとした分子標的療法の開発につながる知見と考えられた。

(3) 時間的経過を経て、良性のグリオーマから悪性神経膠腫に変化した腫瘍細胞において、アポトーシスに關与する FAS 遺伝子と、代表的な癌抑制遺伝子であり腫瘍幹細胞の調節機能への關与も示唆されている TP53 遺伝子の遺伝子異常を認めた (図 7)。

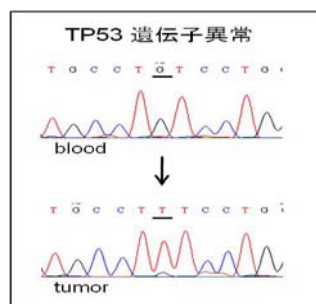


図7

また通常認められる IDH1 遺伝子や EGFR 遺伝子および BRAF 遺伝子の異常は認められな

った。このことより神経膠芽腫の時間的な発生過程において、アポトーシスの調節機能および幹細胞調節を含めた広範な細胞制御機能が關与する発生経路の存在が示唆された。

今後は神経膠芽腫の腫瘍幹細胞において、実際に FAS 遺伝子や TP53 遺伝子がどのように關与するかを、腫瘍細胞および培養細胞を用い検討する予定である。

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 17 件)

- ① Hayashi, Y., Mohri, M., Nakada, M., Hamada, JI., Ependymoma and choroid plexus papilloma as synchronous multiple neuroepithelial tumors in the same patient: a case report and review of literature. Neurosurgery, in press, 査読有
- ② Kita, D., Hayashi, Y., Watanabe, T., Korshunov, A., vonDeimling, A., Nakada, M., Kasahara, Y., Zen, Y., Hamada, JI., Hayashi, Y., Secondary anaplastic astrocytoma developing in a young adult with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). Neuropathol Appl Neurobiol, in press, 査読有
- ③ Suzuki, T., Nakada, M., Yoshida, Y., Nambu, E., Furuyama, N., Kita, D., Hayashi, Y., Hayashi, Y., Hamada, JI., The correlation between promoter methylation status and the expression level of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in recurrent glioma. Jpn J Clin Oncol, 41(2011), 190-196, 査読有
- ④ Yoshida, Y., Nakada, M., Harada, T., Tanaka, S., Furuta, T., Hayashi, Y., Kita, D., Uchiyama, N., Hayashi, Y., Hamada, JI.,

The expression level of sphingosine-1-phosphate receptor type 1 is related to MIB-1 labeling index and predicts survival of glioblastoma patients. *J Neurooncol*, 98(2010), 41-47, 査読有

⑤ Hayashi, Y., Nakada, M., Tanaka, S., Uchiyama, N., Hayashi, Y., Kita, D., Hamada, JI., Implication of 5-aminolevulinic acid fluorescence of the ventricular wall for postoperative communicating hydrocephalus associated with cerebrospinal fluid dissemination in patients with glioblastoma multiforme: a report of 7 cases. *J Neurosurg*, 112(2010), 1015-1019, 査読有

⑥ Hayashi, Y., Watanabe, T., Nakada, M., Kita, D., Hayashi, Y., Uchiyama, N., Hamada, JI., BCL10 single nucleotide polymorphism and its association with CSF dissemination of primary intracranial germ cell tumors, *Pediatr Neurosurg*, 45(2009), 291-295, 査読有

⑦ Miyashita, K., Kawakami, K., Nakada, M., Mai, W., Shakoori, A., Fujisawa, H., Hayashi, Y., Hamada, JI., Minamoto, T., Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3beta inhibition against human glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 15(2009), 887-897, 査読有

⑧ Hayashi, Y., Uchiyama, N., Hayashi, Y., Nakada, M., Iwato, M., Kita, D., Higashi, R., Hirota, Y., Kai, Y., Kuratsu, J., Hamada, JI., A reevaluation of the primary diagnosis of hemangiopericytoma and the clinical importance of differential diagnosis from solitary fibrous tumor of the central nervous system. *Clin Neurol*

Neurosurg, 111(2009), 34-38, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 林裕、中田光俊、喜多大輔、佐野宏樹、田中慎吾、長谷川貴之、林康彦、内山尚之、濱田潤一郎、巨大 insular glioma 摘出の問題点、第 15 回日本脳腫瘍の外科学会、2010 年 10 月 2 日、大阪市中央公会堂 (大阪府)
- ② 林裕、木下雅史、中田光俊、毛利正直、林康彦、内山尚之、濱田潤一郎、頭蓋咽頭腫に対する transcranial approach において三半規管削除が術野に及ぼす影響、第 69 回日本脳神経外科学会学術総会、2010 年 10 月 28 日、福岡国際会議場 (福岡県)
- ③ 渡邊卓也、信澤純人、喜多大輔、中田光俊、林裕、濱田潤一郎、大垣比呂子、神経腫における IDH1/2 遺伝子変異の意義、第 69 回日本脳神経外科学会学術総会、2010 年 10 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡県)
- ④ 中田光俊、林裕、宮下勝吉、渡邊卓也、Pyko Iiya、喜多大輔、近野祐里、林康彦、内山尚之、川上和之、源利成、濱田潤一郎、膠芽腫における GSK3 β 研究の進展とその阻害薬剤を使用した再発膠芽腫に対する第 I/II 相臨床試験、第 69 回日本脳神経外科学会学術総会、2010 年 10 月 29 日、福岡国際会議場 (福岡県)
- ④ Hayashi, Y., Watanabe, T., Nakada, M., Kita, D., Hayashi, Y., Uchiyama, N., Hamada, JI., Frequent single nucleotide polymorphism (SNP) of BCL10 and association with poor prognosis in primary intracranial germ cell tumors, 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, 2009. 5. 12, PACIFICO YOKOHAMA (JAPAN)
- ⑤ 林裕、中田光俊、田中慎吾、上出智也、林康彦、内山尚之、濱田潤一郎、Non-enhancing intrinsic tumor (NEIT) にお

いて摘出率が予後に及ぼす影響と術中モニタリングの重要性、第 68 回日本脳神経外科学会学術総会、2009 年 10 月 15 日、京王プラザホテル（東京都）

⑥ 林裕、中田光俊、木下雅史、内山尚之、新多寿、長谷川光広、山下純宏、濱田潤一郎、坐位手術の有用性、第 67 回日本脳神経外科学会学術総会、2008 年 10 月 2 日、岩手県民会館（岩手県）

〔図書〕（計 2 件）

① 林裕、濱田潤一郎、MEDICAL VIEW（ビジュアル脳神経外科 1、前頭葉・頭頂葉）、2010 年、116 頁～123 頁

② Nakada M, Kita D, Hayashi Y, Kawakami K, Hamada JI, Minamoto T, Springer Verlag (RNA technologies and their applications), 2010, pp107-129

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：脳腫瘍治療用キット及び脳腫瘍治療方法

発明者：中田光俊、源利成、林裕、濱田潤一郎

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2010-185691

出願年月日：2010 年 8 月 22 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 裕 (HAYASHI YUTAKA)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：90262568

(2) 研究協力者

中田 光俊 (NAKADA MITSUTOSHI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：20334774

喜多 大輔 (KITA DAISUKE)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：10377385