

機関番号：13301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21689038

研究課題名（和文） グリオーマ幹細胞の浸潤関連分子の同定と機能解析

研究課題名（英文） The identification of invasion associated genes in glioma stem cell

研究代表者

中田 光俊（NAKADA MITSUTOSHI）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20334774

研究成果の概要（和文）：本研究では、幹細胞様グリオーマ細胞の高い浸潤能を規定する分子を探索した。グリオーマ組織中の CD133 陽性細胞において普遍的に integrin  $\alpha 3$  が高発現していることを見出した。ヒト膠芽腫組織において、浸潤グリオーマ細胞に integrin  $\alpha 3$  の局在を認めた。Integrin  $\alpha 3$  の発現とグリオーマ細胞の浸潤能は正の相関を示し、その下流のシグナルとして extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 が示された。integrin  $\alpha 3$  は ERK1/2 の活性を介して幹細胞様グリオーマ細胞の遊走・浸潤能を亢進させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Glioma stem-like cells are shown to be invasive but its mechanism remains to be elucidated. In this study we demonstrate the function of integrin in glioma stem-like cell invasion. The expression profile of integrin family in CD133+ and - cells was determined. Integrin  $\alpha 3$  was overexpressed in CD133 + cells compared with CD133- cells. Immunohistochemistry demonstrated the localization of integrin alpha3 in invading glioblastoma cells. The activity of glioma cell invasion was associated with the expression level of integrin  $\alpha 3$ . The migration activity of glioma cell lines was linked to the phosphorylation level of ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2. Our results suggest that endogenous integrin alpha3 contributes the invasive nature of glioma stem-like cells, which renders integrin alpha3 as a prime candidate for anti-invasion therapy for glioblastoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：グリオーマ、幹細胞、浸潤、インテグリン

## 1. 研究開始当初の背景

脳内原発の悪性神経膠腫は本邦で年間 2,500 人の発生があり、人類に残された致死

的悪性腫瘍の一つである。開頭手術後に放射線・化学療法を加える集学的治療を行っても 5 年生存率は 5%、平均生存期間 1 年と治療

困難である。悪性神経膠腫は浸潤性増殖が顕著で、正常脳に浸潤する形で発育するため、手術で全部摘出することは不可能である。このことから、悪性神経膠腫の分子生物学的特性を知る上で神経膠腫細胞が正常脳に浸潤する分子機構の理解は極めて重要である。悪性神経膠腫の治療開発を考える時、浸潤に寄与する分子の同定は必須と考えられる。

一方で近年、悪性神経膠腫に内在する腫瘍幹細胞が分離され脳腫瘍研究領域が新たな局面を迎えている。悪性脳腫瘍における腫瘍内在幹細胞の抽出は他臓器がん先に先駆けて成功し、研究領域は急速に拡大している。悪性神経膠腫幹細胞は脳内への浸潤能が極めて高くかつ放射線、抗がん剤に抵抗性を示すため、これが腫瘍再発の原因になっていると推測される。しかし悪性神経膠腫幹細胞の浸潤メカニズムに迫る報告は皆無である。悪性神経膠腫幹細胞浸潤の分子機構の研究は始まったばかりで解析途上にあり不明な点が多い。これを明らかにすることは悪性脳腫瘍のバイオロジーを理解する上で急務であると言える。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性神経膠腫において、腫瘍幹細胞を分離抽出し浸潤能に関与する分子の探索を行い、候補分子の機能解析を行うとともに腫瘍組織における発現と局在を検討し、真の浸潤関連分子を同定することから治療標的分子を探ることにある。

## 3. 研究の方法

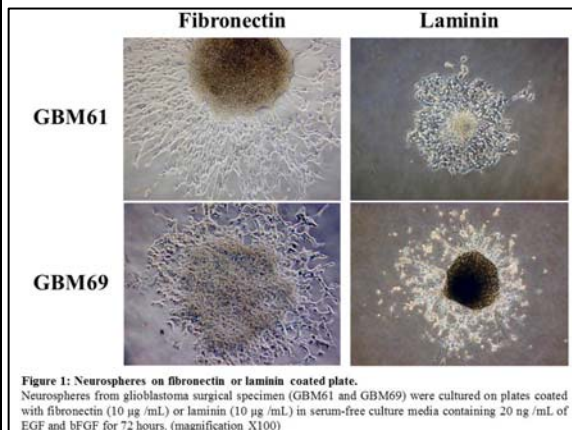
本研究では、グリオーマ細胞株および手術検体を使用し、neurosphere 法および CD133 陽性細胞磁気分離法により幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団を得た。手術検体由 neurosphere を細胞外基質 (fibronectin もしくは laminin) でコーティングしたディッシュ上に播種し、形態変化を観察した。グリオーマ細胞株および手術検体より CD133 陽性細胞と陰性細胞とを分離し、定量的 RT-PCR を行うことで、CD133 陽性細胞において普遍的に発現している幹細胞様グリオーマ細胞浸潤関連分子の同定を試みた。次に免疫組織学的にヒトグリオーマ組織における候補分子の発現を検討した。複数のグリオーマ細胞株を用いて候補分子が細胞の遊走・浸潤能、および増殖能に与える影響を検証し、そのメカニズムを検討した。さらに候補分子の細胞遊走・浸潤を亢進させるメカニズムを解明するために下流のシグナル伝達を解析した。

## 4. 研究成果

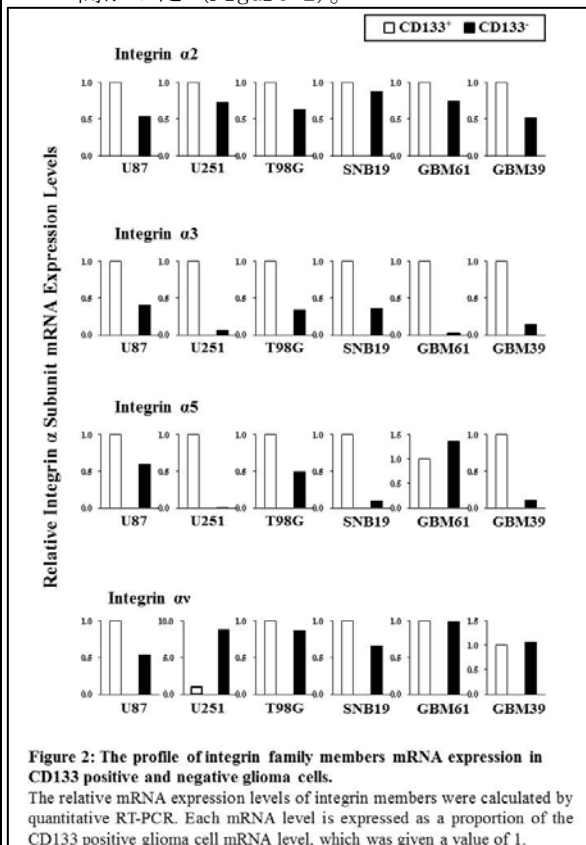
グリオーマ手術検体並びに細胞株より幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団を抽出し、その集団の接着分子に関し検討を行うことに

より下記の4点を明らかにした。

1. Neurosphere は fibronectin もしくは laminin コートを施したディッシュに接着した (Figure 1)。



2. CD133 陽性細胞磁気分離法により得た幹細胞様グリオーマ細胞濃縮集団では、全ての細胞種において CD133 陰性細胞分画と比較し integrin  $\alpha 3$  の mRNA の発現が高かった (Figure 2)。

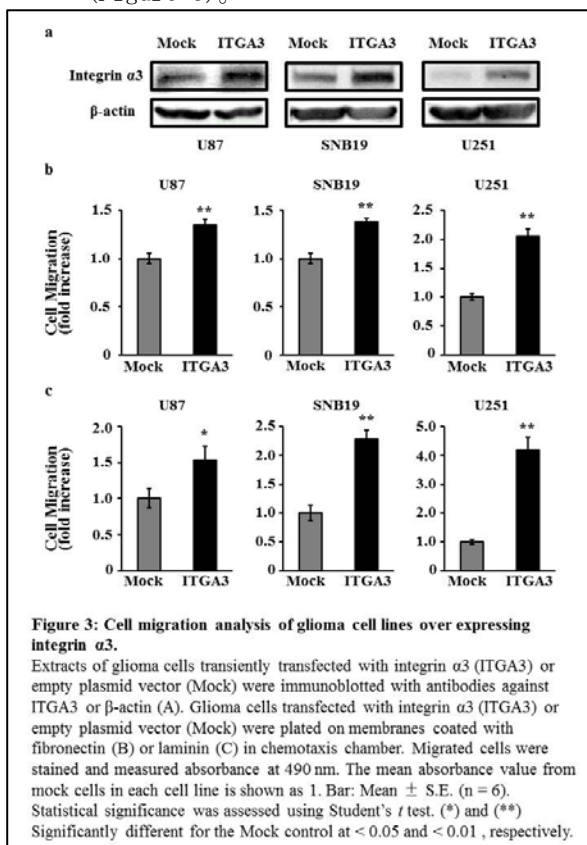


3. Integrin  $\alpha 3$  は neurosphere において発現していた。

4. ヒトグリオーマ組織において浸潤グリオーマ細胞および、幹細胞様グリオーマ細胞がプールされているとされる腫瘍血管周囲に存在するグリオーマ細胞に integrin  $\alpha 3$  の局在を認めた。

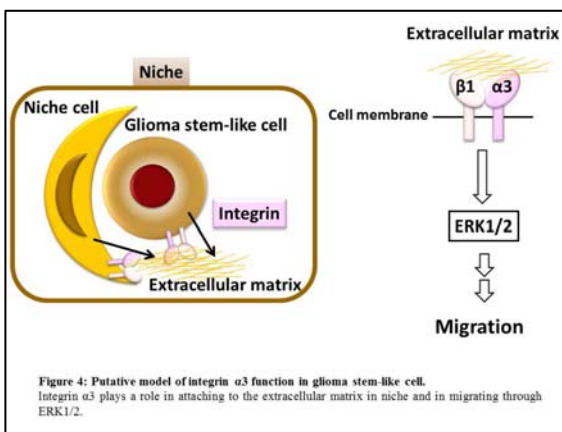
続いてグリオーマ細胞株 U87 細胞、SNB19 細胞、U251 細胞を用い integrin  $\alpha 3$  の遊走・浸潤・増殖能を検討し、さらにそのシグナル伝達を解析し下記の 4 点の知見を得た。

- Integrin  $\alpha 3$  を強制発現させた全ての細胞の遊走能および浸潤能は有意に亢進し、内因性 integrin  $\alpha 3$  の発現を低下させた細胞では低発現株以外の細胞株において遊走能および浸潤能は有意に低下した (Figure 3)。



- SNB19 細胞において integrin  $\alpha 3$  の発現上昇に伴い細胞増殖能が有意に亢進し、発現量の低下によって増殖能は有意に低下した。
- Integrin  $\alpha 3$  の発現量を上昇させることで ERK1/2 の活性は上昇し、Integrin  $\alpha 3$  の発現を低下させると ERK1/2 の活性も低下した。

以上より、integrin  $\alpha 3$  は幹細胞様グリオーマ細胞において強く発現し、主として ERK1/2 の活性上昇を介して遊走・浸潤能を亢進させることが示唆された。本研究は幹細胞様グリオーマ細胞において integrin  $\alpha 3$  が高発現し、グリオーマ細胞の浸潤能に integrin  $\alpha 3$  が大きく関与することを示すことにより幹細胞様グリオーマ細胞の浸潤における integrin  $\alpha 3$  の重要性を示唆した (Figure 4)。



近年、がん幹細胞を標的とする新たな治療法が模索されている。Integrin  $\alpha 3$  の制御により幹細胞様グリオーマ細胞の浸潤を阻害することで画期的なグリオーマ治療につながる可能性があると考えられる。

#### 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)

[雑誌論文] (計 15 件)

- Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada JI. Target signaling pathways in glioma. *Cancers* in press 査読有
- Misaki K, Nakada M, Mohri M, Hayashi Y, Hamada JI. MGMT promoter methylation and temozolomide response in choroid plexus carcinoma. *Brain Tumor Pathol* Mar 26, 2011 [Epub ahead of print] 査読有
- Teng L, Nakada M, Zhao SG, Endo Y, Furuyama N, Nambu E, Pyko IV, Hayashi Y, Hamada JI. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. *British Journal of Cancer* 104:798-807, 2011 査読有
- Tanaka S, Nakada M, Hayashi Y, Nakada S, Kitamura-Sawada S, Furuyama N, Suzuki T, Kamide T, Hayashi Y, Yano S, Hamada JI. Epithelioid glioblastoma changed to typical glioblastoma: the methylation status of MGMT promoter and 5-ALA fluorescence. *Brain Tumor Pathol* 28:59-64, 2011 査読有
- Muraguchi T, Tanaka S, Yamada D, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii T, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Ino Y, Todo T, Kuratsu JI, Saya H, Hamada JI, Hirao A. NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells. *Can Res* 71:1135-45, 2011 査読有
- 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 *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in recurrent glioma. *Jpn J Clin Oncol* 41:190-6, 2011 査読有
7. Kita D, Hayashi Y, Watanabe T, Korshunov A, von Deimling A, Nakada M, Kinoshita M, Uchiyama N, Kasahara Y, Zen Y, Hamada JI, Hayashi Y. Secondary anaplastic astrocytoma developing in a young adult with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2010 Sep 15 [Epub ahead of print] 査読有
  8. Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, Huse JT, Pedraza A, Utsuki S, Yasui Y, Tandon A, Fomchenko EI, Oka H, Levine RL, Fujii K, Ladanyi M, Holland EC. PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes & Development* 24: 2205-2218, 2010 査読有
  9. 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: 41-47, 2010 査読有
  10. Nakada M, Anderson EM, Demuth T, Nakada S, Reavie LB, Drake KL, Hoelzinger DB, Berens ME. The phosphorylation of ephrin-B2 ligand promotes glioma cell migration and invasion. *Int J Cancer* 126: 1155-1165, 2010 査読有
  11. Yoshida Y, Nakada M, Sugimoto N, Harada T, Hayashi Y, Kita D, Uchiyama N, Hayashi Y, Yachie A, Takuwa Y, Hamada JI. Sphingosine-1-phosphate receptor type 1 regulates glioma cell proliferation and correlates with survival of patients with glioblastoma. *Int J Cancer* 126: 2341-2352, 2010 査読有
  12. Kamide T, Nakada M, Hayashi Y, Suzuki T, Hayashi Y, Uchiyama N, Kijima T, Hamada JI. Radiation induced cerebellar high grade glioma accompanied by meningioma and cavernoma 29 years after the treatment of medulloblastoma: a case report. *J Neurooncol* 100:299-303, 2010 査読有
  13. Miyashita K, Kawakami K, Nakada M, Mai W, Shakoori A, Fujisawa H, Hayashi Y, Hamada JI, Minamoto T. Potential effect of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition against human glioblastoma. *Clin Can Res* 15: 887-897, 2009 査読有
  14. Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada JI, Hirao A. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17163-17168, 2009 査読有
  15. Miyashita K, Nakada M, Shakoori A, Ishigaki Y, Shimasaki T, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. An emerging strategy for cancer treatment targeting aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9: 1114-1122, 2009 査読無
- [学会発表] (計 12 件)
1. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Kita D, Hayashi Y, Hayashi Y, Hamada JI. Integrin alpha3 is involved in the invasive behavior of glioma stem-like cells. Society for Neuro-Oncology 15th Annual Meeting 2010, November 18-21, 2010, Le Centre Sheraton Hotel (Canada)
  2. 中田光俊、林裕、宮下勝吉、渡邊卓也、Pyko Ilya、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 $\beta$  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総会, 平成 22 年 10 月 27 日-29 日, 福岡コンベンションセンター(福岡県)
  3. 中田光俊. 既存の薬剤を使用した悪性脳腫瘍に対する分子標的療法 (講演), 創剤フォーラム第 16 回シンポジウム, 平成 22 年 10 月 22 日, アルカディア市ヶ谷(東京都)
  4. 中田光俊、林裕、宮下勝吉、喜多大輔、林康彦、内山尚之、川上和之、源利成、濱田潤一郎. Clinical trial for treatment of recurrent glioblastoma targeting deregulated GSK3 $\beta$  in combination with temozolomide 第 69 回日本癌学会学術総会, 平成 22 年 9 月 22 日-24 日, 大阪国際会議場(大阪府)
  5. 中田光俊、林裕、渡邊卓也、吉川陽文、長谷川貴之、河原庸介、池田千絵美、大槻純男、寺崎哲也、濱田潤一郎. 定量的プロテオミクスを利用した悪性脳腫瘍に対する個別化分子標的療法. 第 11 回日本分子脳神経外科学会, 平成 22 年 8 月 27 日-28 日, 長陵会館記念ホール(宮城県)
  6. 中田光俊. 悪性脳腫瘍の浸潤機構と化学療法 (講演), Global COE “Network Medicine”主催セミナー, 平成 22 年 7 月 20

- 日, 東北大学(宮城県)
7. Nakada M. The mechanism of glioma invasion and anti-invasion therapy. (Invited Lecture). The 4<sup>th</sup> Harbin International Neurosurgical Conference. July 16-18, 2010, Harbin Medical University (中国)
  8. Nakada M. Eph/ephrin tyrosine kinase in glioma invasion. (Meet the Expert Lecture) 7<sup>th</sup> Meeting for the Asian Society for Neuro-Oncology, June 10-12, 2010, JW Marriott Hotel (韓国)
  9. Nakada M., Hayashi Y, Miyashita K, Kita D, Hayashi Y, Uchiyama N, Kawakami K, Minamoto T, Hamada JI. Targeting glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in adult recurrent glioblastomas. (Oral presentation). 7<sup>th</sup> Meeting for the Asian Society for Neuro-Oncology, June 10-12, 2010, JW Marriott Hotel (韓国)
  10. 中田光俊. 悪性グリオーマの浸潤機構と抗浸潤療法 (特別講演). 第5回脳腫瘍の基礎シンポジウム, 平成22年1月30日, 大手町サンケイプラザ(東京都)
  11. Nakada M., Nambu E, Yoshida Y, Furuyama N, Kita D, Hayashi Y, Hayashi Y, Uchiyama N, Hamada JI. Integrin alpha3 prevents neurosphere formation and proliferation of glioma stem cells. 2009 Joint Meeting of the Society for Neuro-Oncology and the AAAS/CNS Section on Tumors, October 22-24, 2009, Hilton New Orleans Riverside (USA)
  12. 中田光俊、林裕、喜多大輔、宮下勝吉、玉瀬玲、上出智也、田中慎吾、林康彦、内山尚之、源利成、濱田潤一郎. 再発神経膠芽腫に対する GSK3 $\beta$ を分子標的とした Phase I/II 相臨床試験 (シンポジウム). 第68回日本脳神経外科学会総会, 平成21年10月14日-16日, 京王プラザホテル(東京都)

[図書] (計 2 件)

1. Nakada M., Minamoto T, Pyko IV, Hayashi Y, Hamada JI. The pivotal role of GSK3 $\beta$  in glioma biology. Brain Tumor/Book 2, ed. Miklos Garami, InTech, 2011 in press
2. Nakada M., Kita D, Hayashi Y, Kawakami K, Hamada JI, Minamoto T. RNAi in malignant brain tumors: relevance to molecular and translational research. ***RNA Technologies and Their Applications***, eds. Erdmann VA & Barciszewski J, Springer-Verlag Heidelberg, 107-129, 2010

[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 2010-18569  
 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

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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし