慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	グリオーマ幹細胞の二ッチ特性の解明とそれを標的とした治療戦略の考案
Sub Title	Characterization and targeting strategies for the glioma stem cell niche
Author	Sampetrean, Oltea
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	グリオーマ幹細胞の自己複製を担保する二ッチの阻害はグリオーマ幹細胞の根絶に繋がると考えられている。膠芽腫において血管性二ッチと低酸素二ッチが報告されているが、その特性は十分に解明されていない。本研究では二ッチのライブイメージングを行い、二種類の二ッチ及び二ッチ内の幹細胞の可視化に成功した。その結果、二つの二ッチが同一腫瘍内に存在しうること、異なる時期に形成されることを見出した。さらに、二つの二ッチと離れて存在し、自ら分泌する因子を介し微小環境を変える幹細胞が存在することを見出した。このようなグリオーマ幹細胞が形成する自律性二ッチの解明は二ッチ療法を確立する上で不可欠であると考えられた。 Eradication of glioma stem cells (GSC) is a critical task in the treatment of glioblastoma. Inhibition of the GSC niche results in loss of self-renewal of the stem cell pool and is therefore considered a promising new treatment. For GCSs, the existence of perivascular and hypoxic niches has been reported. However, their characteristics and the conditions of their formation is still not sufficiently understood. In this study, we performed live imaging of the GSC niche and succeeded in visualizing both niches and their interaction with the GSCs. We found that the two niches can co-exist within the same tumor, but their evolution throughout the tumor formation process is variable. Interestingly, we also found a subpopulation of GSCs that does not associate with either blood vessels or hypoxic regions. These GSCs secrete factors which can alter the microenvironment and create their own niche. Further investigations of such niches will be necessary to establish anti-niche therapies.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K07124 研究分野：腫瘍生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K07124seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０７１２４

研究課題名（和文）グリオーマ幹細胞のニッチ特性の解明とそれを標的とした治療戦略の考案

研究課題名（英文）Characterization and targeting strategies for the glioma stem cell niche

研究代表者
サンペトラ　オルテア（SAMPETREAN, OLTEA）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：５０５７１１１３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：グリオーマ幹細胞の自己複製を担保するニッチの阻害はグリオーマ幹細胞の根絶に繋がると考えられている。膠芽腫において血管性ニッチと低酸素ニッチが報告されているが、その特性は十分に解明されていない。本研究ではニッチのライブイメージングを行い、二種類のニッチ及びニッチ内の幹細胞の可視化に成功した。その結果、二つのニッチが同一腫瘍内に存在しうること、異なる時期に形成されることを見出した。さらに、二つのニッチと離れて存在し、自ら分泌する因子を介し微小環境を変える幹細胞が存在することを見出した。このようなグリオーマ幹細胞が形成する自律性ニッチの解明はニッチ療法を確立する上で不可欠であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
膠芽腫において、グリオーマ幹細胞を標的とした新しい治療戦略が期待されている。グリオーマ幹細胞ニッチの形成時期、成立条件及び分子機構の解明はニッチ、膠芽腫に関する生物学的理解を深め、抗ニッチ療法の確立につながると期待できる。また、ニッチ成分解析より浮かび上がった因子、特に代謝関連因子はトレーサー画像診断においてマーカーとして利用できる可能性があり、今後、腫瘍再発の早期発見につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Eradication of glioma stem cells (GSC) is a critical task in the treatment of glioblastoma. Inhibition of the GSC niche results in loss of self-renewal of the stem cell pool and is therefore considered a promising new treatment. For GCSs, the existence of perivascular and hypoxic niches has been reported. However, their characteristics and the conditions of their formation is still not sufficiently understood. In this study, we performed live imaging of the GSC niche and succeeded in visualizing both niches and their interaction with the GSCs. We found that the two niches can co-exist within the same tumor, but their evolution throughout the tumor formation process is variable. Interestingly, we also found a subpopulation of GSCs that does not associate with either blood vessels or hypoxic regions. These GSCs secrete factors which can alter the microenvironment and create their own niche. Further investigations of such niches will be necessary to establish anti-niche therapies.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞　ニッチ　悪性脳腫瘍　膠芽腫

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

2 年以下の生存しか望めない膠芽腫において、その幹細胞（Glioma stem cells：GSC）を標的とした新しい治療戦略が期待されている。GSC の自己複製、未分化能を担保するニッチの阻害は GSC の根絶に繋がると考えられている。GSC ニッチとして血管性ニッチと低酸素ニッチの存在が報告されているが、その特性はまだ十分に解明されていない。本研究では GSC とニッチのライブイメージングを行い、ニッチが形成される条件、ニッチの種類、性質及び構成成分を明らかにすることを目標とした。さらに、GSC とニッチの相互作用を分子レベルで解析し、GSC の自己複製を阻害しうるニッチ関連因子の同定を目指した。

２．研究の目的

抗 GSC ニッチ療法の細胞及び分子標的の同定を最終目標に、本研究ではマウスの膠芽腫モデルを用いて
（１）血管性ニッチと低酸素ニッチが腫瘍形成過程のどの時期に形成されるか、また、同一腫瘍内に存在するかの評価
（２）血管性ニッチと低酸素ニッチのライブイメージング及び構成成分の解明
（３）血管性ニッチと低酸素ニッチを占拠する GSC の特性の解明
（４）血管性ニッチと低酸素ニッチを制御する遺伝子・分子の候補の探索
を目的とした。

３．研究の方法

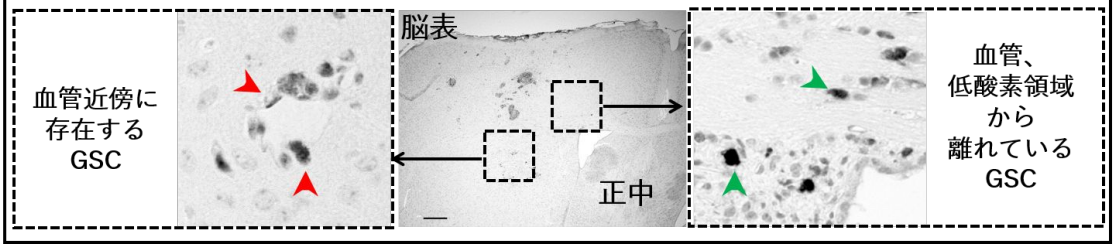
マウスの膠芽腫モデルとして Ink4a/Arf$^{-/-}$ HRasV12^{+}誘導型脳腫瘍幹細胞に基づいた移植モデル及び p53$^{-/-}$; Nf1$^{-/-}$ (MADM)遺伝子改変マウスにおける悪性神経膠腫の自然発生モデルを用いて、以下の解析を実施した。
（１）腫瘍形成過程の複数の段階（早期、中期、後期）から培養脳切片及びパラフィン切片を作成し、GSC の局在及び GSC 周囲の微小環境を評価した。
（２）蛍光標識抗体あるいは蛍光色素を用いて、培養脳切片において血管、マイクログリア、低酸素領域のライブイメージングを行い、GSC とのインターアクションについて検証した。血管空はレクチン、血管内皮細胞は抗 CD31 抗体、マイクログリアは抗 F4/80 抗体、低酸素領域は Image-iT® Green Hypoxia Reagent を用いて検出した。また、増殖因子などの液性因子の解析及び添加実験を行い、GSC の生存を担保するニッチ因子について検討した。
（３）酸素濃度が異なる条件で生存・増殖する GSC を単離し、RNA 抽出を行い、マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。
（４）バイオインフォマティックスの手法を用いて、上記解析の結果からニッチを制御する因子の候補について検討した。

４．研究成果

（１）本研究で使用したマウスモデルにおいて血管近傍の GSC は浸潤先進部で有意に多く、低酸素領域は腫瘍中心部に特異的に認められた。この結果は膠芽腫の臨床検体を用いた研究に基づいた論文報告と一致していることから、マウスモデルでは膠芽腫の病理像が再現され、ニッチの局在及び成分解析が可能であると考えられた。GSC をマウスの前脳に移植する評価系及び脳腫瘍自然発生モデルの評価系のいずれにおいても GSC の血管への親和性が高く、血管性ニッチは腫瘍形成過程の早期から後期まで確認され、時間とともに拡大する傾向にあった。一方、低酸素ニッチは腫瘍塊が増大する時期に特異的に出現した。また、成過程の後期では血管性ニッチ、低酸素ニッチの両方が同一腫瘍内に存在しうることが確認された。興味深いことに

一部の GSC は血管とも低酸素領域とも離れた領域に存在することが明らかになり（図 1）、血管性ニッチ、低酸素ニッチと異なる種類のニッチも存在する可能性が示唆された。

図1. GSCとそのニッチの局在



（２）マイクログリア、免疫細胞、反応性アストロサイトの可視化により、血管性ニッチを構成する細胞成分は腫瘍形成時期によって異なることがわかった。早期では正常細胞の割合が高く、後期では GSC 及び血管内皮細胞が有意に多かった。低酸素領域にはマイクログリア、免疫細胞及び反応性アストロサイトは確認されなかった。これらの結果より二つのニッチに共通した細胞成分は GSC のみであると考えられた。ニッチの液性成分の解析では、ニッチ必須因子として知られている EGF, FGF の外因性供給を必要としない、自律性の高い GSC が存在することが明らかになった。

（３）自然発生のマウス膠芽腫より樹立した複数の脳腫瘍幹細胞分画についてミトコンドリア予備能、酸素消費を測定し、酸素利用が高い腫瘍幹細胞と低い脳腫瘍幹細胞を同定した。それぞれの集団について遺伝子発現解析を行い、その比較より酸素利用型の脳腫瘍幹細胞において発現が高いミトコンドリア代謝関連因子、マットリックス接着因子、血管内皮細胞制御関連因子の候補を同定した。一方、低酸素 GSC において特異的に変動する経路を解析した結果、コレステロール代謝と合成、解糖系及び糖新生、軟骨骨性骨化関連遺伝子が有意に上昇していることが明らかになった（図２）。

図2: 低酸素GSCにおいて特異的に上昇する経路

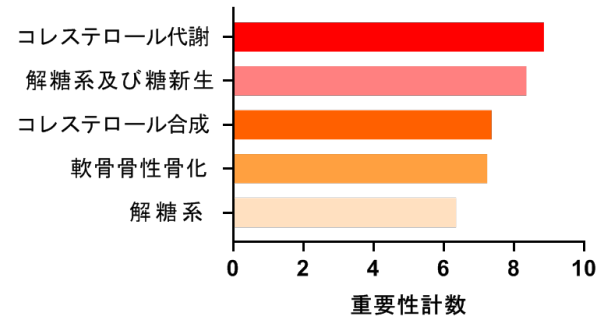
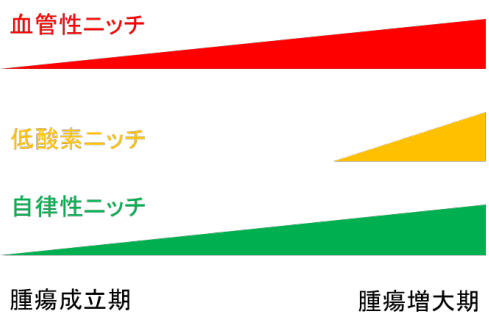


図3: 腫瘍形成過程におけるGSCニッチの推移



（４）血管性ニッチについては同定したニッチ制御因子の候補をヒト膠芽腫のデータベースと照合し、臨床検体において血管近傍に発現が高い因子を絞り込んだ。同定した因子についたは阻害実験を開始し、異常血管の減少を確認した。また、低酸素ニッチに関してはコレステロール代謝の阻害作用を有し、ニッチを減少させること薬剤を同定した。一方、血管性ニッチ、低酸素ニッチとも異なる微小環境に存在する GSC はいずれの場合でも生存、増殖を続けたことから、このような自律性が高く、自らニッチを作る GSC に対してはさらなる治療戦略が必要になると考えられた（図３）。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　17　件）

1. 1. Tamura R, Miyoshi H, Sampetrean O, Shinozaki M, Morimoto Y, Iwasawa C, Fukaya R, Mine Y, Masuda H, Maruyama T, Narita M, Saya H, Yoshida K, Okano H, Toda M. Visualization of spatiotemporal dynamics of human glioma stem cell invasion. **Mol Brain** 2019, 12(1):45. doi: 10.1186/s13041-019-0462-3. **査読あり**

2. Suina K, Tsuchihashi K, Yamasaki J, Kamenori S, Shintani S, Hirata Y, Okazaki S, Sampetrean O, Baba E, Akashi K, Mitsuishi Y, Takahashi F, Takahashi K, Saya H, Nagano O Epidermal growth factor receptor promotes glioma progression by regulating xCT and GluN2B-containing N -methyl- d -aspartate-sensitive glutamate receptor signaling. **Cancer Sci.** 2018, 109:3874–82. doi: 10.1111/cas.13826. **査読あり**

3. Shiota M, Naya M, Yamamoto T, Hishiki T, Tani T, Takahashi H, Kubo A, Koike D, Itoh M, Ohmura M, Kabe Y, Sugiura Y, Hiraoka N, Morikawa T, Takubo K, Suina K, Nagashima H, Sampetrean O, Nagano O, Saya H, Yamazoe S, Watanabe H, Suematsu M. Gold-nanofève surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival. **Nat Commun**. 2018, 19;9(1):1561. doi: 10.1038/s41467-018-03899-1. **査読あり**

4. Harigai R, Sakai S, Nobusue H, Hirose C, Sampetrean O, Minami N, Hata Y, Kasama T, Hirose T, Takenouchi T, Kosaki K, Kishi K, Saya H, Arima Y. Tranilast inhibits the expression of genes related to epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in neurofibromin-deficient cells. **Sci Rep**. 2018, 8(1):6069. doi: 10.1038/s41598-018-24484-y. **査読あり**

5. Shibao S, Minami N, Koike N, Fukui N, Yoshida K, Saya H, Sampetrean O*. Metabolic heterogeneity and plasticity of glioma stem cells in a mouse glioblastoma model. **Neuro Oncol.** 2018, 20(3):343-354. doi: 10.1093/neuonc/nox170. *corresponding author **査読あり**

6. Sampetrean O*, Saya H. Modeling phenotypes of malignant gliomas. **Cancer Sci**. 2018, 109(1):6-14. doi: 10.1111/cas.13351. *corresponding author **査読あり**

7. Kitagawa M, Liao PJ, Lee KH, Wong J, Shang SC, Minami N, Sampetrean O, Saya H, Lingyun D, Prabhu N, Diam GK, Sobota R, Larsson A, Nordlund P, McCormick F, Ghosh S, Epstein DM, Dymock BW, Lee SH Dual blockade of the lipid kinase PIP4Ks and mitotic pathways leads to cancer-selective lethality. **Nat Commun**. 2017, 8(1):2200. doi: 10.1038/s41467-017-02287-5. **査読あり**

8. 9. Minami N, Maeda Y, Shibao S, Arima Y, Ohka F, Kondo Y, Maruyama K, Kusuhara M, Sasayama T, Kohmura E, Saya H, Sampetrean O*. Organotypic brain explant culture as a drug evaluation system for malignant brain tumors. **Cancer Med**. 6(11):2635-2645, 2017. doi: 10.1002/cam4.1174. *corresponding author **査読あり**

9. Chonan Y, Taki S, Sampetrean O, Saya H, Sudo R. Endothelium-induced

three-dimensional invasion of heterogeneous glioma initiating cells in a microfluidic coculture platform. **Integr Biol (Camb).** 9(9): 762-773, 2017. doi: 10.1039/c7ib00091j. **査読あり**

〔学会発表〕（計　12　件）

1. Sampetrean O: Targeting adaptive pathways in glioma stem cells. Taipei Pediatric Neuro-Oncology Symposium and Satellite Meetings for Targeted Research 2018, 2018
2. **サンペトラ・オルテア、南 徳明、小池　直義、佐谷 秀行：グリオーマ幹細胞の代謝柔軟性の克服戦略、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年**
3. **サンペトラ・オルテア、佐谷　秀行：グリオーマ幹細胞の放射線抵抗性の機序、　第 47 回放射線による制癌シンポジウム、2018 年**
4. **サンペトラ・オルテア、南 徳明、佐谷 秀行： グリオーマ幹細胞の代謝特性及び微小環境への適応反応、第 43 回日本微小循環学会総会、2018 年**
5. **サンペトラ・オルテア、佐谷　秀行：脳腫瘍形成過程における代謝特性とその意義、第４０回日本分子生物学会年会、2017 年**
6. **サンペトラ・オルテア、佐谷　秀行：誘導型グリオーマ幹細胞モデルを用いた浸潤克服戦略の開発、第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年**
7. **サンペトラ・オルテア、柴尾 俊輔、南 徳明、佐谷 秀行：脳腫瘍幹細胞の低酸素応答、第 5 回がんと代謝研究会、2017 年**
8. Sampetrean O: Glioma stem cells: heterogeneity patterns and therapeutic challenges, 2nd Asian Central Nervous System Germ Cell Tumor Conference, 2016
9. **サンペトラ・オルテア：脳腫瘍幹細胞における低酸素応答性、代謝不均一性と治療抵抗性、第 14 回がんとハイポキシア研究会、2016 年、招待講演**
10. **サンペトラ・オルテア、柴尾俊輔、南徳明、佐谷秀行：がん幹細胞の代謝不均一性及び可塑性、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年、招待講演**
11. **サンペトラ・オルテア：脳腫瘍幹細胞における代謝可塑性、第４回がんと代謝研究会、2016 年、招待講演**
12. **サンペトラ・オルテア：脳腫瘍幹細胞における不均一性、可塑性と治療抵抗性、第 25 回定位放射線治療学会、2016 年、招待講演**

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０　件）

○取得状況（計　０　件）

〔その他〕

ホームページ等
慶應義塾大学医学部・先端医科学研究所・遺伝子制御研究部門
http://www.genereg.jp/

６．研究組織

(1)研究分担者
該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。