

博士論文

神経膠腫幹細胞の分化に伴う細胞老化と
腫瘍進展におけるその意義

(Senescence derived from glioma stem cell differentiation and
its implication in the tumor progression)

大内 梨江

目次

序論	3
第 1 章 NSGCs のテロメラーゼ活性消失による末端複製問題と細胞増殖停止 . 5	
要約	5
1-1. ウシ胎児血清による GSCs から NSGCs への分化誘導	6
1-2. NSGCs のテロメラーゼ活性消失と細胞増殖停止	12
考察	17
第 2 章 NSGCs における細胞老化	19
要約	19
2-1. NSGCs における細胞老化	20
2-2. BMP4 による NSGCs の分化と細胞老化	24
2-3. 腫瘍組織中の老化 NSGCs の存在	27
考察	32
第 3 章 老化 NSGCs における血管新生関連液性因子の放出	35
要約	35
3-1. 老化 NSGCs における血管新生関連遺伝子の発現	36
3-2. 老化 NSGCs における血管新生関連液性因子の放出	40
考察	43

第4章 老化 NSGCs による血管新生の促進と GSC 由来腫瘍形成の向上.....	45
要約	45
4-1. 老化 NSGCs による血管内皮細胞の増殖促進.....	46
4-2. 老化 NSGCs による腫瘍内の血管新生促進	52
4-3. 老化 NSGCs による GSC 由来腫瘍形成の向上	55
考察	57
総括	59
参考文献.....	63
略語	72
謝辞	73

序論

神経膠芽腫 (Glioblastoma: GBM) は、グリア細胞から発生した脳腫瘍の一種であり、4段階で評価される悪性度の中で最も高いグレード4に分類される。GBM患者の平均生存期間は、わずか2年。GBMは、脳腫瘍の中で極めて予後不良である。GBMに対する現在の治療法は、処置可能な範囲を外科的に摘出し、その後、腫瘍の浸潤・進展の程度に応じて放射線療法や化学療法が実施される。これまで、GBMに対する化学療法は、唯一、アルキル化剤であるテモゾロミド (テモダール) の使用のみだったが¹、近年、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) -Aを阻害することで血管新生を抑えると期待されるベバシズマブ (アバスチン) が治療薬として新たに適応になった²。異常な血管分布が、GBMの腫瘍組織中で観察されており、悪性度の原因として挙げられているためである^{3,4}。一方、最新の知見ならびに技術を駆使し、GBM治療の開発が進められている中、未だ多くのGBM患者が命を落としている現状を鑑みれば、GBM根治療法の確立は急務であるといえる。

GBMは、複数の細胞種によって構築された不均一な細胞集団である^{5,6}。不均一な細胞集団は、がん細胞に加え、血管を構築する細胞やミクログリアやマクロファージといった炎症細胞、間質に富んでいる^{7,8}。がん細胞の中には、幹細胞性を有したグリオーマ幹細胞 (glioma stem cells: GSCs) の存在が明らかとなっている^{9,10}。GSCsは、自己複製能、腫瘍形成能、多分化能を保持しており、ヒエラルキー (幹細胞システム) の頂点に位置し、GBMを構築すると考えられている^{9,11,12}。近年のフローサイトメトリーや免疫化学染色技術を始めた細胞分離・同定技術の著しい進歩に伴い、GSCsは、膜タンパク質 Promin1 (CD133)、転写因子 SOX2 や Olig2、中間径フィラメントタンパク質 Nestin を発現していることがわかっている^{13,14}。また、幹細胞培養技術の発展により、現在、生体外においてもスフェア培養法と呼ばれる無血清培地条件下で GSCs の維持が可能である^{15,16}。スフェア培養下での GSCs は、全ての細胞で CD133 を発現するスフェアを構築し (自己複製能)¹⁷、免疫不全マウスに移植されると、多種の細胞で構築された腫瘍を形成する (腫瘍形成能、多分化能)^{15,16}。GSCs

は、従来の化学療法や放射線療法に耐性を示すことから^{11,12}、GBMの発生・進行に加え再発の主因であると考えられており、現在、GSCsを標的としたGBM治療法の開発が活発的に進められている。

GBMの大半を占めるがん細胞は、非グリオーマ幹細胞 (non-stem glioma cells: NSGCs) である^{9,10}。NSGCsは、GSCsから分化して得られることが生体内/外で観察されている。生体外の場合、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) や骨形成因子 (bone morphological protein: BMP) 4により、GSCsから生体内と同様の性質を示すNSGCsに分化する^{18,19}。NSGCsは、正常なアストロサイトマーカーであるグリア細胞線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) や神経細胞マーカー β -tubulin III (Tuj1) 等を発現している^{9,10}。一般的に、NSGCsは、GSCsと異なり、細胞増殖に限りがあり、腫瘍形成能を有していない^{9,10}。そのため、NSGCsは、主にGBMの嵩として考えられている。しかし、近年、脳腫瘍以外のがん種において、非がん幹細胞が、がんの悪性化や治療抵抗性に寄与する報告がなされている²⁰⁻²³。卵巣がんでは、CD133陰性の非がん幹細胞が、上皮間葉転換を介して、転移能を獲得する²²。前立腺がんでは、非がん幹細胞が、傍分泌作用を通じて、がん幹細胞の転移能獲得を促す^{20,21}。乳がんにおける非がん幹細胞は、がん幹細胞によく似た細胞に脱分化することなどが挙げられる²³。以上の報告は、NSGCsが、GBMの悪性化において重要な役割を担っており、GBMを治療する上で標的になりうる細胞であることを示唆する。そこで、私は、NSGCsの性質ならびにGBM中での役割を解明することにした。

本論文にて、NSGCsのテロメラーゼ活性消失による末端複製問題と細胞増殖停止 (第1章)、NSGCsにおける細胞老化 (第2章)、老化NSGCsにおける血管新生関連液性因子の放出 (第3章)、老化NSGCsによる血管新生の促進とGSC由来腫瘍形成の向上 (第4章) から得られた新しい知見を通じて、GBM中のNSGCsの存在意義について考察した。

第 1 章 NSGCs のテロメラーゼ活性消失による 末端複製問題と細胞増殖停止

要約

この章で、私は、2名の GBM 患者から樹立された GSCs が、ウシ胎児血清添加により NSGCs に分化することを確認した。また、GSCs から NSGCs への分化過程で、テロメラーゼ活性の消失やテロメア長の短縮が認められた。さらに、GSCs から分化した NSGCs は、最終的に細胞増殖停止に至った。以上の結果から、NSGCs は、テロメラーゼ活性消失による末端複製問題に伴い、細胞増殖停止に至ることがわかった。

1-1. ウシ胎児血清による GSCs から NSGCs への分化誘導

目的

2名の GBM 患者由来 GSCs が、分化誘導でよく用いられるウシ胎児血清により NSGCs に分化するかどうかを明らかにする。

材料・方法

細胞培養

本研究で用いた GBM146 と GBM157 GSCs は、2名の GBM 患者から、スフェア培養法により樹立された^{15,16}。私は、それら GSCs をスフェア培養法により培養し、GSCs の性質を維持した。NSGCs への分化誘導には、10%ウシ胎児血清 (FBS) と 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (10,000 U/mL) を添加した DMEM/F12 medium を用いた。U251 は、過去の報告と同様の方法で培養維持した²⁴。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは過去の報告と同様の方法で行った¹⁵。

Allophycocyanin-conjugated anti-CD133 抗体 (293C3; Miltenyi Biotec, San Diego, CA, USA) と共に細胞を4℃・30分間でインキュベートした。その後、FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて陽性細胞数を計測した。そのデータは、FlowJo 7.6.1 softwareによって解析した。

ウェスタンブロット解析

細胞抽出物を用いて、過去の報告と同様の方法でウェスタンブロット解析を行った²⁵。用いた抗体の種類および濃度は、下記の通りである: rabbit anti-SOX2 (3579S, 20 ng/mL; Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA), rabbit

anti-Nestin (ab5326, 2 µg/mL; Millipore, Billerica, MA, USA), mouse anti-β-actin (A5441, 1:10,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。

逆転写-リアルタイムPCR

RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて培養細胞から RNA を抽出し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で定量化した。その後、Super Script III First-Strand synthesis system for qRT-PCR キット (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、fluorescein (FAM) でラベル化された Universal Probe Library probes で遺伝増幅産物 (*CD133*, *SOX2*, *Olig2*) を追跡し、LightCycler 480 により検出した。全てのプライマーやプローブは、Universal Probe Library Assay Design Center (<https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>) を元に設計した。

蛍光免疫染色

培養細胞を、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS) で希釈した 2% もしくは 4% のパラホルムアルデヒドで室温・10 分間で固定し、PBS で希釈した 0.5% のノニデット P-40 で透過処理した。染色は、rabbit anti-SOX2 抗体 (3579S, 20 ng/mL) を用いて過去に報告された方法で行った²⁶。

スフェアアッセイ

10% FBS を含む DMEM/F12 medium の培養下で GSCs を 5 日間あるいは 20 日間培養した。その後、細胞を無血清のスフェア培養液に移し、24-ウェルプレート (1×10^5 個の細胞/ウェル) で 7 日間培養した。7 日後、細胞数を測定した。

結果

FBS を含まない培地条件下 (スフェア培養法) で、GBM146 と GBM157 の GSCs がスフェアを形成し、主要な GSC マーカーである *CD133* と *SOX2* の発

現を維持していることを確認した (Fig.1A-C)。過去の報告から、これら GSCs は、腫瘍形成を有していることも確認されている¹⁴。次に、GSCs を、分化誘導するため、FBS (以後、血清と表記) 入りの培地に移行した。細胞は、ディッシュの底に接着し、樹上突起の形態を示した (Fig.1A)。フローサイトメトリーの結果から、CD133 陽性細胞は、血清添加後 5、20 日目で、減少、消失した (Fig.1D)。また、GSC マーカー SOX2 と Nestin のタンパク質発現、ならびに、*CD133*、*SOX2*、*Olig2* の遺伝子発現においても同様の結果が得られた (Fig.1E,F)。蛍光免疫染色の結果からも、SOX2 陽性細胞の頻度は、血清添加後、顕著に減少した (Fig.1G)。さらに、スフェアアッセイにより細胞のスフェア構築能を評価したところ、GSCs は、30 個以上のスフェアを構築した。一方、血清添加 5 日目の GSCs は、半分以下のスフェアしか構築しなかった。20 日目の GSCs は、スフェアを構築しなかった (Fig.1H)。以上の結果から、GSCs は、血清添加により、がん幹細胞性を消失し、血清添加 20 日目までに NSGCs に分化することがわかった。

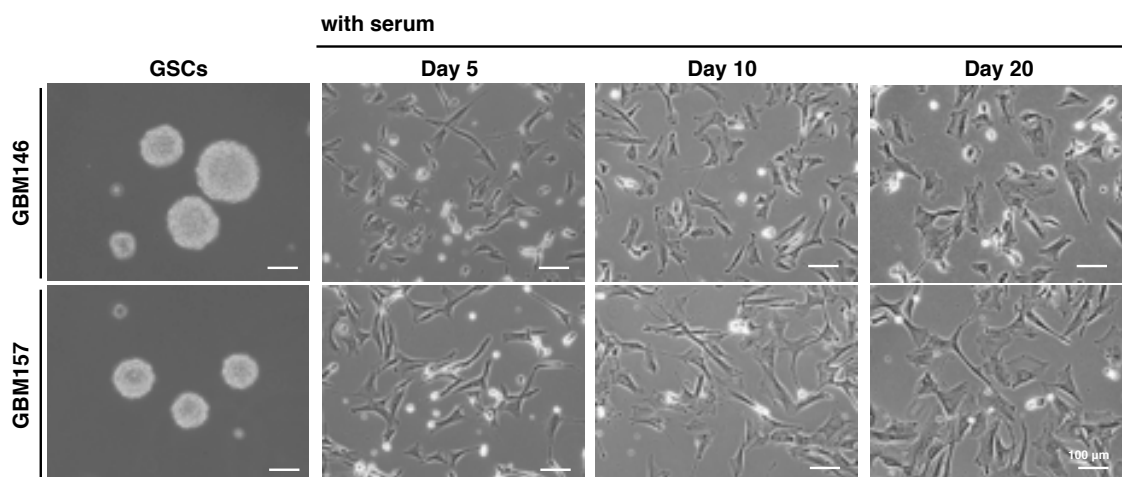


Figure 1A. GSCs were adherent and sharp in serum-containing medium. Morphological change of GSCs at the indicated time after serum exposure. Cells were cultured in neurosphere culture medium (GSCs) or in serum-containing medium.

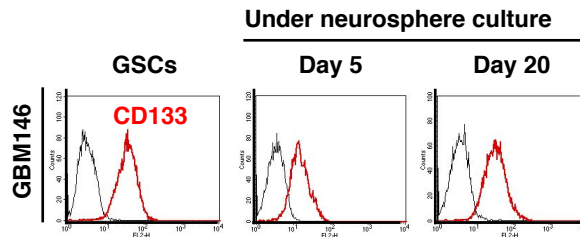


Figure 1B. Flow cytometry of CD133-positive cells in neurosphere culture medium. *Grey*: normal immunoglobulin as negative control.

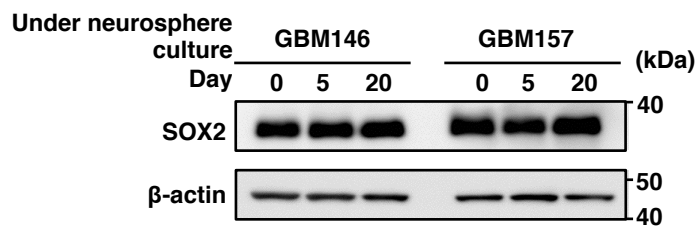


Figure 1C. Western blot analysis of SOX2 in neurosphere culture medium. β -actin was used as an internal control.

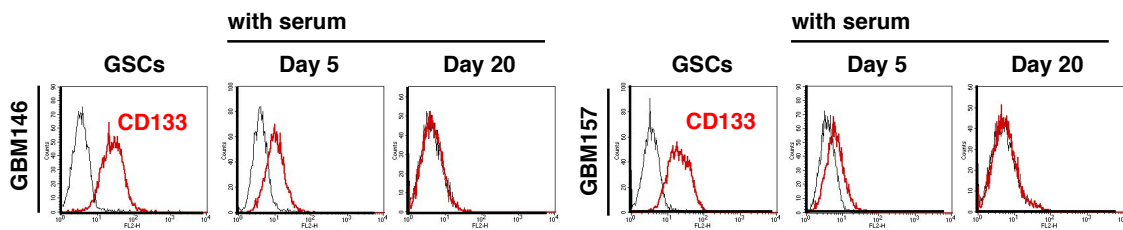


Figure 1D. Flow cytometry of CD133-positive cells in serum-containing medium. *Grey*: normal immunoglobulin as negative control.

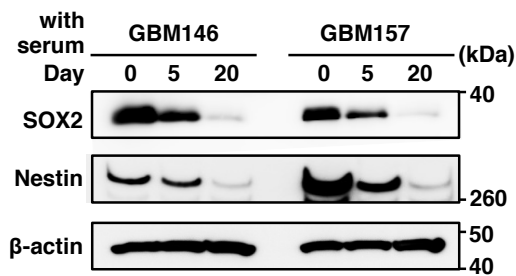


Figure 1E. Western blot analysis of SOX2 and Nestin in serum-containing

medium. β -actin was used as an internal control.

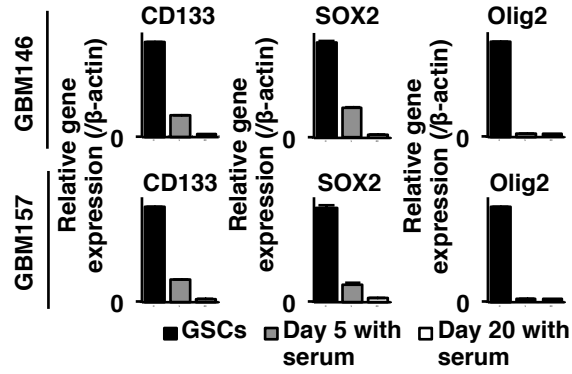


Figure 1F. Quantitation of *CD133*, *SOX2* and *Olig2* transcripts by RT-qPCR. The expression value for each gene was normalized with that of β -actin.

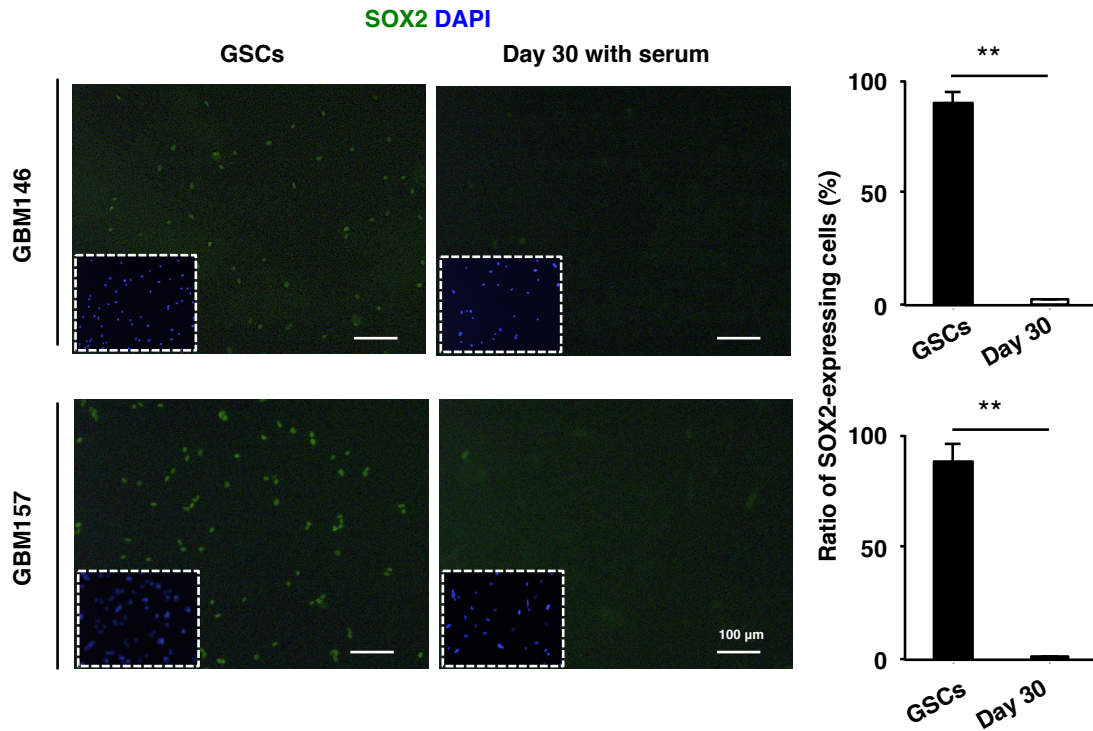


Figure 1G. Immunofluorescence staining of SOX2 in serum-treated GSCs. Right graphs indicate quantitation of the SOX2-expressing cells ($n > 90$).

Error bars, standard deviations. Statistical evaluations were performed using the Welch t test. **, $P < 0.01$.

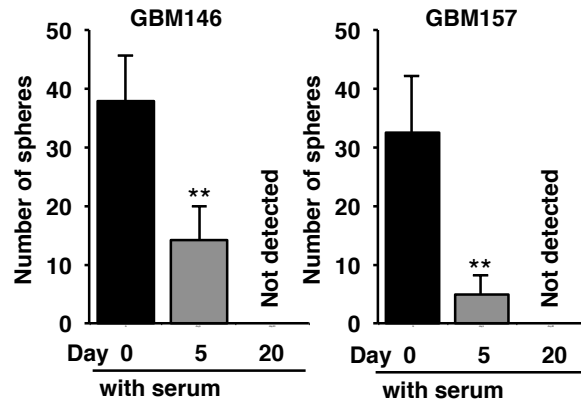


Figure 1H. Sphere-forming assay. Cells were cultured in serum-containing medium for 5 or 20 days, and subsequently transferred into serum-free, neurosphere culture medium. The number of spheres was counted at day 7 of culture. Error bar, standard deviation. Statistical evaluations were performed using the Welch t test. **, $P < 0.001$.

1-2. NSGCs のテロメラーゼ活性消失と細胞増殖停止

目的

NSGCs は、細胞増殖に限りがあることが報告されている²⁷。私は、GSCs から NSGCs への分化過程での細胞増殖変化を追い、その変化とテロメア維持機構の関与を明らかにする。

材料・方法

ポピュレーションダブリング (Population doubling: PD) 解析

1 × 10⁶個の細胞を10 cmディッシュにまいた。コンフルエントに達した細胞を1:2もしくは1:8で継代した。PDは、毎回の継代ごとに計測され、グラフの縦軸に表記された数は、毎回計測された数が追加されている。

テロメアサザンブロット解析とテロメア反復配列増幅法 (Telomeric repeat amplification protocol: TRAP) 解析

テロメアとサブテロメアを含む末端標識制限酵素断片は、³²P-labeled (CCCTAA)_n プローブと共にサザンブロット解析により検出した²⁵。テロメラーゼ活性は、TRAP解析により検出した²⁸。

逆転写-リアルタイムPCR

第1章 (1-1) に記した方法で行った。

蛍光免疫染色と蛍光 *in situ* hybridization (FISH) の同時染色 (IF-FISH)

培養細胞を、PBS で希釈した 2%のパラホルムアルデヒドで室温・10 分間で固定し、PBS で希釈した 0.5%のノニデット P-40 で透過処理した。過去に報告された方法で、rabbit anti-53BP1 抗体 (4937, 0.08 µg/mL; Cell Signaling Technology) を用いた蛍光免疫染色と Cy3 でラベル化されたテロメア特異的

(CCCTAA)₃ ペプチド核酸プローブ(Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria)を用いた FISH を行った²⁹。

結果

PD 解析にて GSCs から NSGCs への分化過程での細胞増殖変化を追跡した。GSCs は、血清添加 10 日間早い速度で増殖したが、徐々に速度を落とし、既に NSGCs に分化している血清添加 30 日目には細胞増殖停止に至った (Fig.1I)。細胞の分裂寿命は、細胞の分裂ごとに短縮する DNA 末端領域であるテロメアの長さが指標となり、制御している³⁰。そこで、NSGCs の細胞増殖停止にテロメア維持機構が関わっているのかを次に明らかにすることにした。GBM146 を対象とした TRAP 解析の結果から、GSCs は、血清添加後 3 日間、テロメア再生酵素であるテロメラーゼ活性を高く保持していたが、10 日目以降、消失した (Fig.1J)。テロメラーゼの構成因子 *hTERT* の遺伝子発現も、血清添加後、顕著に減少した³¹ (Fig.1K)。また、テロメア長を測定するサザンブロットアッセイを行った結果、テロメアの長さは、血清添加後、徐々に短縮した (Fig.1L)。一方、IF-FISH の結果から、テロメア機能不全により誘導されるフォーカス telomere dysfunction-induced foci (TIFs) の頻度は、GSCs と血清添加 30 日目の NSGCs で差を見いだせなかった (Fig.1M)。以上の結果から、NSGCs は、テロメラーゼ活性の消失により末端複製問題を引き起こし、最終的に細胞増殖停止に至ることが示唆された。

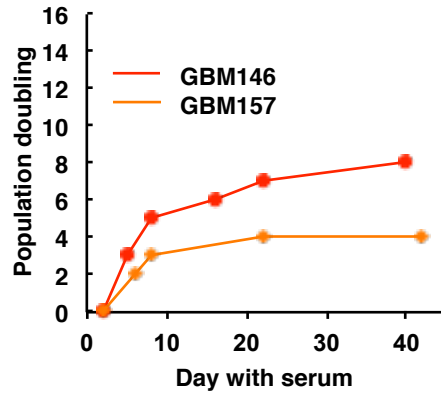


Figure 1I. Limited replicative potential of NSGCs. The cumulative number of population doublings in serum-containing medium was measured.

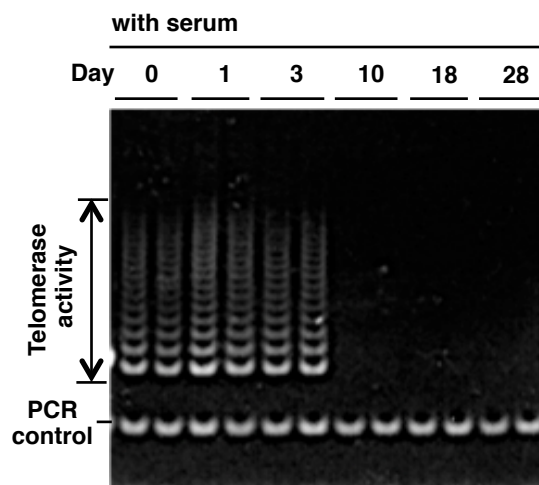


Figure 1J. Telomerase activity in GBM146 cells. Cells were cultured in the serum-containing medium for the indicated time periods and cell lysates were subjected to TRAP assay. Ladders indicate telomerase activity. Internal control for the PCR is shown at the bottom of each lane.

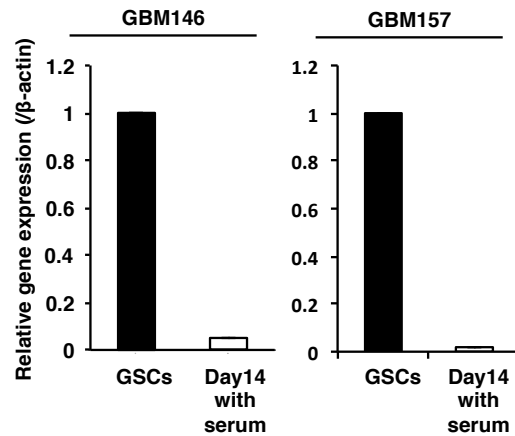


Figure 1K. Quantitation of *hTERT* transcripts by RT-qPCR. The expression value for each gene was normalized with that of *β-actin*.

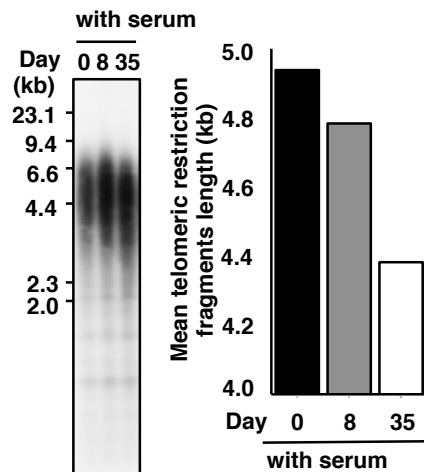


Figure 1L. Telomere Southern blot analysis of GBM146 cells. Cells were cultured in serum-containing medium for the indicated time periods and genomic DNA was subjected to Southern blot analysis. The signal indicates the telomere restriction fragment, which contains both telomeric and subtelomeric sequences. Thus, the graph on the right shows the sum of telomere and subtelomere (several kb) lengths.

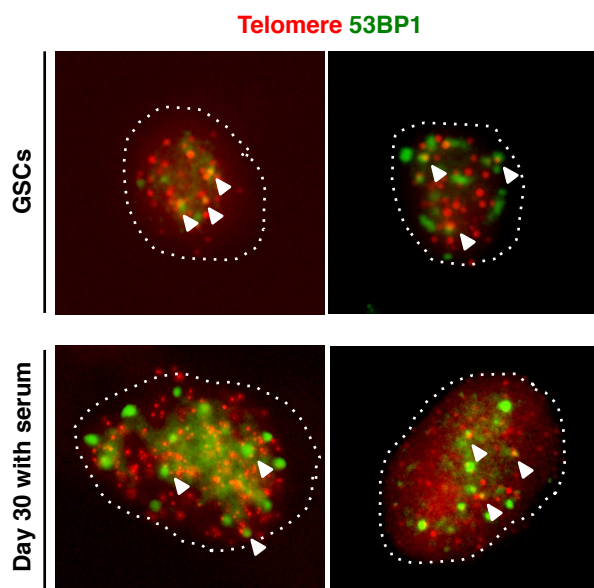


Figure 1M. Combined telomere FISH and immunofluorescence staining in GSCs and NSGCs at day 30. Arrowheads indicate colocalization between telomeres and 53BP1 (TIFs).

考察

本章で、GSCs が、血清により NSGCs に分化し、テロメラーゼ活性消失後、テロメア複製問題に伴い細胞増殖停止に至ることがわかった。

過去の知見で、スフェア培養下でスフェアを構築する全ての細胞で CD133 の発現が確認され、全ての細胞が GSCs であることが示唆された¹⁷。しかし、本研究のスフェアアッセイの結果から (Fig.1H)、スフェア培養下の全ての細胞が、スフェア構築能を有しているわけではないことが明らかとなり、GSCs の性質を維持している細胞は一部であることが示唆された。また、GSC マーカー SOX2 に蛍光たんぱく質を付加したベクターウイルスを感染させた GSCs をスフェア培養下で維持すると、SOX2 の発現は、スフェロイドの内部で観察されたが、外部では観察されなかった (データは示さず)。GSCs は、以前から低酸素状態を好むことから、スフェロイドの内部にある細胞が GSCs の性質を保持しやすいのかもしれない^{32,33}。最近では、ヒストン修飾因子であるポリコーム群たんぱく質 Ezh2 が、CD133 よりも GSCs のマーカーとして適していることが多々報告されている³⁴⁻³⁶。本研究の GeneChip マイクロアレイの結果からも、Ezh2 の発現は、GBM146 と GBM157 のどちらにおいても、GSCs で特異的な発現が認められている。マーカーによって発現細胞が異なるため、今後、実験を遂行していく上で、GSCs を指標とするマーカーの選択が非常に重要であるといえる。

細胞の分裂寿命は、細胞の分裂ごとに短縮する DNA 末端領域であるテロメアの長さが指標となり、制御している³⁰。通常、正常細胞は、生殖細胞や一部の幹細胞以外、テロメラーゼ活性を著しく減弱しているため、細胞分裂を繰り返しながら、テロメア (末端) の複製問題を引き起こす³⁷。それらの細胞は、テロメア長が限界まで短くなると、テロメア機能不全により、細胞増殖停止に至る。一方、大半のがん細胞は、テロメラーゼ活性を保持していることから、一定のテロメア長を維持し、不死化している^{38,39}。本研究においても、テロメラーゼ活性をもつ GSCs は常に増殖していた。一方、GSCs から分化した NSGCs は、テロメラーゼ活性の消失により、最終的に細胞増殖停止に至ることがわかった (Fig.1I,J)。NSGCs のテロメア短縮速度は約 70bp/PD であることが示さ

れ (Fig.1L)、過去の知見で観察されるテロメラーゼ不活性細胞における速度と相関がとれる⁴⁰。以前から、NSGCsが細胞増殖を停止することは知られていたが²⁷、本研究により、その細胞増殖停止に至る過程で、テロメラーゼ活性消失ならびに末端複製問題が誘起されていることが初めて明らかとされた。一方、細胞増殖停止したNSGCsにおいてテロメアの機能不全 (TIFs) が確認されなかったことから (Fig. 1M)、テロメア短縮が、NSGCsの細胞増殖停止の誘因であるかは未だにわからない。2章に続く実験結果を踏まえ、総括で考察することにする。

第 2 章 NSGCs における細胞老化

要約

本章で、私は、前章で認められた細胞増殖停止 NSGCs が細胞老化を引き起こしていることを明らかにした。さらに、生体内/外で GSCs を分化誘導することで知られている BMP4 を用いた分化誘導実験系においても、GSCs は、NSGCs に分化し、老化細胞の性質を示した。また、GBM 腫瘍組織中においても老化 NSGCs の存在が認められた。以上の結果から、NSGCs は、生体内/外で自発的に細胞老化を引き起こすことが示唆された。

2-1. NSGCs における細胞老化

目的

細胞増殖停止 NSGCs は、細胞老化のひとつの指標である肥大化を起こしていたことから、老化している可能性が示唆される。そこで、細胞増殖停止 NSGCs における細胞老化の評価を行う。

材料・方法

老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (Senescence-associated β -galactosidase: SA- β -gal) 染色

FBS 添加 DMEM/F12 medium で培養した細胞を 6-ウェルプレート (1×10^5 個の細胞/ウェル) に移行した。翌日、過去の報告と同様の方法で SA- β -gal 染色を行った⁴¹。

フローサイトメトリーとプロピジウムイオダイド (Propidium Iodide: PI) 染色

細胞を70%の冷エタノールで固定し、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase Aで37°C・30分間インキュベートした。その後、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PIにより染色した。その後、第1章 (1-1) に記した方法でフローサイトメトリーを行った。

ウエスタンプロット解析

第1章 (1-1) に記したウエスタンプロット解析の方法で行った。抗体は、下記を用いた：rabbit anti-p53 (sc6243, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-p21 (610233, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; BD Biosciences), rabbit anti-pRB (9308, 68 ng/mL; Cell Signaling Technology), mouse anti-RB (554136, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; BD Biosciences), mouse anti-p16 (550834, 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$; BD Biosciences), mouse anti- β -actin (A5441, 1:10,000; Sigma-Aldrich), mouse anti-GAPDH (10R-G109a, 0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Fitzgerald, Acton, MA, USA)。

蛍光免疫染色

第1章(1-1)に記した方法で mouse anti-p21 抗体 (610233, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; BD Biosciences) を用いて行った。

結果

細胞増殖停止 NSGCs は、老化細胞で観察される肥大化の形態を示していた⁴² (Fig.1A, 2A)。老化の評価によく用いられる SA- β -gal 染色の結果から、血清添加 5 日目では観察されなかった SA- β -gal 活性を示す青い染色細胞が、20 日目、30 日目と時間に伴い増加した⁴³ (Fig.2A)。PI 染色後のフローサイトメトリーの結果から、GSCs に比べ、血清添加 30 日目の NSGCs では、老化細胞で認められる 4 倍体以上の細胞が増加した⁴⁴ (Fig.2B)。また、ウエスタンブロット解析の結果から、細胞老化誘導因子 p53、p21、脱リン酸化 RB (不活性型) のタンパク質発現は、GSCs と比較し、血清添加後顕著な増加を示した⁴² (Fig.2C)。蛍光免疫染色の結果から、GSCs に比べ、血清添加 30 日目の NSGCs では、p21 を発現する細胞の頻度が顕著に増加していることも認められた (Fig.2D)。一方、細胞老化誘導因子の一つである p16 の発現は観察されなかった⁴² (Fig.2E)。

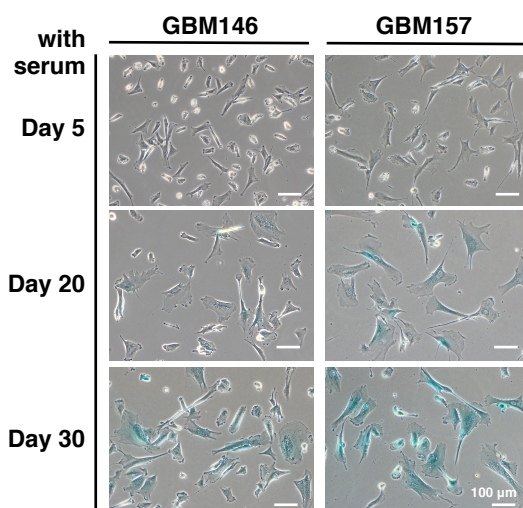


Figure 2A. SA- β -gal staining. Blue-coloured cells are SA- β -gal-positive, which means senescence.

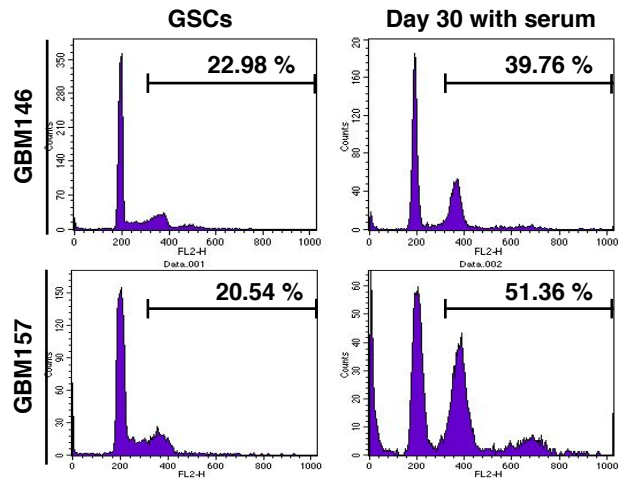


Figure 2B. PI staining of cellular DNA. *Value* indicates the percentage of cells at ploidy larger than 4N, which is a hallmark of senescent cells.

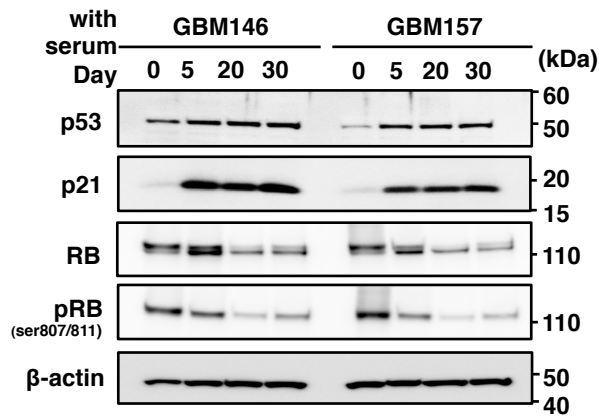


Figure 2C. Western blot analysis of cell cycle-inhibitory proteins. RB gave double bands of phosphorylated (upper, inactive) and dephosphorylated (lower, active) proteins. pRB means inactivated RB that is phosphorylated at Ser 807 and 811. β-actin was used as an internal control.

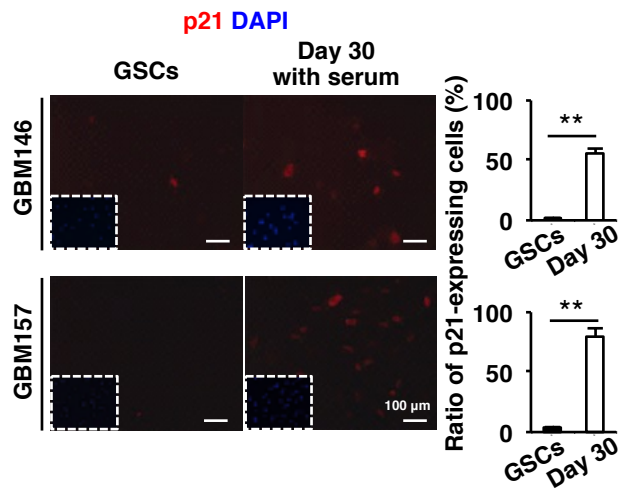


Figure 2D. Immunofluorescence staining of p21 in GSCs and NSGCs. Graphs on right indicates quantitation of the p21-expressing cells ($n > 90$). Error bars, standard deviations. Statistical evaluations were performed using the Welch t test. **, $P < 0.01$.

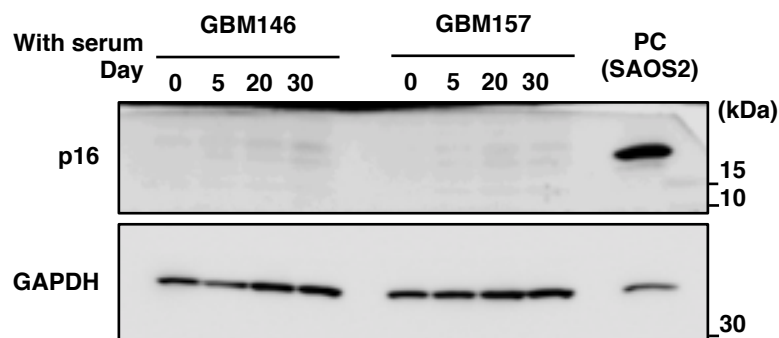


Figure 2E. Western blot analysis of p16. PC: SAOS2 cells as positive control for p16 expression.

2-2. BMP4 による NSGCs の分化と細胞老化

目的

血清が GSCs を NSGCs に分化することはわかっているが、その誘導メカニズムは、未だによくわかっていない。そこで、生体内/外で GSCs の分化誘導因子として知られる骨形成たんぱく質 BMP4 を用いた分化誘導実験系でも NSGCs の老化現象が認められるかを明らかにする^{19,45}。

材料・方法

細胞培養

血清による分化誘導実験系により早い段階で分化と老化の誘発が観察された GBM157 GSCs を用いた。GSCs を分化誘導するため、ラミニンでコートしたディッシュ (L2020; Sigma-Aldrich) と 10 ng/mL BMP4 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、2%B-27 supplement (Invitrogen)、1%GlutaMAX (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK)、1%ペン/ストレプトが添加された DMEM/F12 medium を用いた。

逆転写-リアルタイムPCR

第 1 章 (1-1) に記した方法で行った。

Population doubling (PD) 解析

第1章 (1-2) に記した方法で行った。

SA-β-gal 染色

第 2 章 (2-1) に記した方法で行った。

結果

BMP4 添加培地下に GSCs を移行させると、CD133 の陽性細胞は、徐々に減少、消失した (Fig.2F)。また、GSC マーカー *SOX2* と *Olig2* の遺伝子発現も同様の結果であった (Fig.2G)。細胞は、BMP4 添加後 10 日間、早い速度で増殖したが、その後すぐに細胞増殖停止に至った (Fig.2H)。また、SA- β -gal の活性は、BMP4 添加 5 日目の細胞では認められなかったが、30 日目の大半の細胞で観察された (Fig.2I)。以上の結果から、BMP4 により、GSCs は NSGCs に分化し、NSGCs は最終的に細胞老化を引き起こすことがわかった。また、NSGCs の老化という現象が、血清によるカルチャーショックでないことが示唆された。

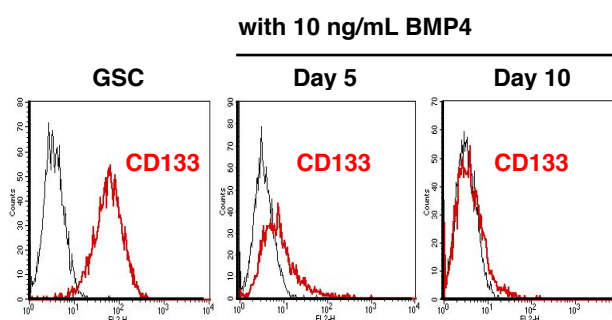


Figure 2F. Flow cytometry of CD133-positive cells cultured in BMP4-containing medium (10 ng/mL). *Grey*: normal immunoglobulin as negative control.

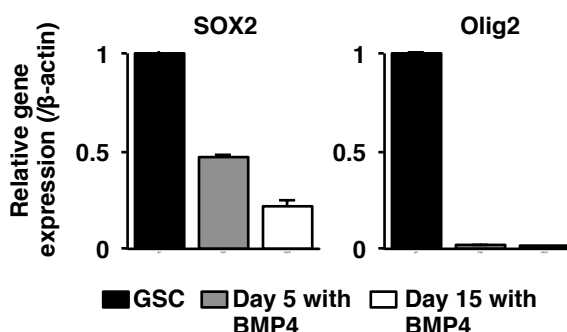


Figure 2G. RNA expression of *SOX2* and *Olig2* measured by RT-qPCR. The expression value for each gene was normalized with that of β -actin.

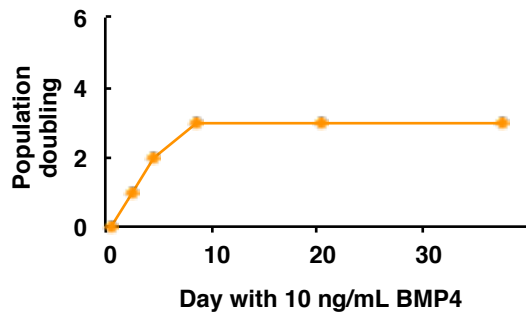


Figure 2H. Limited replicative potential of NSGCs. The cumulative number of population doublings in BMP4-containing medium was measured.

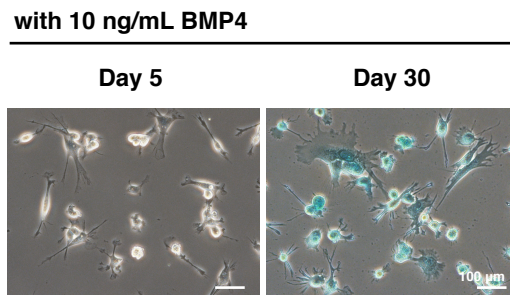


Figure 2I. SA-β-gal staining. Blue colour indicates senescence.

2-3. 腫瘍組織中の老化 NSGCs の存在

目的

in vitro で認められた老化 NSGCs が、*in vivo* にも存在しているのかを明らかにする。

材料・方法

マウスの異種移植実験

6週目のメス・免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) の皮下に GSCs (5×10^6 個の細胞、 1×10^7 個の細胞、 2×10^7 個の細胞、 4×10^7 個の細胞) を移植した。上記の細胞は、マトリゲル (Corning, Tewksbury, MA, USA) と共に 1:1 の比率で混ぜてから移植した。本論文に記載の動物実験はすべて公益財団法人がん研究会動物実験等取扱規定に従って行った (承認番号: 癌化動第 10-03-11 号)。

組織化学染色

異種移植実験から得られた腫瘍を、Mildform 10N (133-10311; Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japan) により固定し、パラフィン包埋後 $4-5 \mu\text{m}$ に薄切した。ISU Abxis (A221V; Seoul, Korea) と US Biomax (GL806c; Rockville, MD, USA) で、ホルマリン固定されたパラフィン包埋のヒトGBM組織のティッシュアレイを購入した。下記の抗体を用いて、過去の報告と同様の方法で組織化学染色を行った²⁸: mouse anti-GFAP (MAB360, 1:300; Millipore), rabbit anti-53BP1 (4937, 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Cell Signaling Technology), mouse anti-p21 (610233, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Cell Signaling Technology), rabbit anti-p53 (sc6243, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Nestin (ab5326, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Millipore), rabbit anti-IL-6 (ab6672, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; abcam, Cambridge, MA, USA)。

SA- β -gal 染色

異種移植実験で得られた腫瘍組織を、Optimal Cutting Temperature Compound で包埋し、液体窒素で凍結した。その組織を 4-5 μm に薄切し、第 2 章 (2-1) に記した方法で染色した。

蛍光免疫染色

異種移植実験で得られた凍結腫瘍組織を 4-5 μm に薄切し、冷アセトン/メタノールで -20°C ・10分固定した。細胞に関しては、第1章 (1-1) と同様の固定方法を行った。下記の抗体を用いて、第1章 (1-1) に記した方法で染色した: mouse anti-GFAP (MAB360, 1:300; Millipore), mouse anti-p21 (610233, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Cell Signaling Technology), rabbit anti-IL-6 (ab6672, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; abcam), rabbit anti-GFAP (ab7260, 1:1,000; abcam), mouse anti-Ki67 (M7240, 1:50; DAKO, Ely, UK)。

結果

GBM 患者の腫瘍組織 21-30 個のうち、NSGC マーカー GFAP の発現は全ての組織で認められた⁹(Fig.2J)。そのうち、DNA 損傷の応答に関わる因子 53BP1 や細胞老化誘導因子 p53 や p21 は、腫瘍全体に点在していた (Fig.2J)。発現細胞の頻度に個体差があったものの、それぞれのマーカー発現腫瘍組織は、全体の 70%以上と高頻度であった (Fig.2J)。GBM146 と GBM157 の GSC 由来のマウス異種移植においても、GFAP を発現する細胞周辺で p53、p21 や老化細胞から放出されることで知られるインターロイキン-6 (interleukin-6: IL-6) の発現が確認された⁴² (Fig.2K)。さらに、SA- β -gal 活性陽性細胞は、p53 欠損 GBM 細胞株 U251 由来異種移植組織では認められなかったが、GSC 由来の腫瘍組織では広範囲に認められた (Fig.2L)。さらに、NSGCs が細胞老化誘導因子を発現しているのかを明らかにするため、GSC 由来の腫瘍組織で GFAP と p21 もしくは IL-6 で共染色した。結果、p21/GFAP 発現細胞と IL-6/GFAP 発現細胞が、腫瘍全体に点在していた (Fig.2M)。しかし、共発現細胞の存在頻度

は、腫瘍組織中 10%以下で低かった。一方、*in vitro* 下の GSCs で高く発現する増殖マーカーKi67 の発現細胞は、腫瘍組織中の GFAP 陰性細胞で高頻度に観察された (Fig.2M, N)。以上の結果から、老化 NSGCs は、*in vivo* の GBM 組織中にも存在していることが示唆された。臨床組織においても NSGCs が老化関連マーカーを発現しているか明らかにするため、臨床組織と同様のホルマリン固定パラフィン包埋 GSC 由来の腫瘍組織で NSGC マーカーと老化関連マーカーの共染色を行った。しかし、マーカーの発現を確認できなかった (データは示さず)。今後、共染色で用いた GSC 由来組織と同様に、凍結した臨床標本を用いた検証が必要であるといえる。

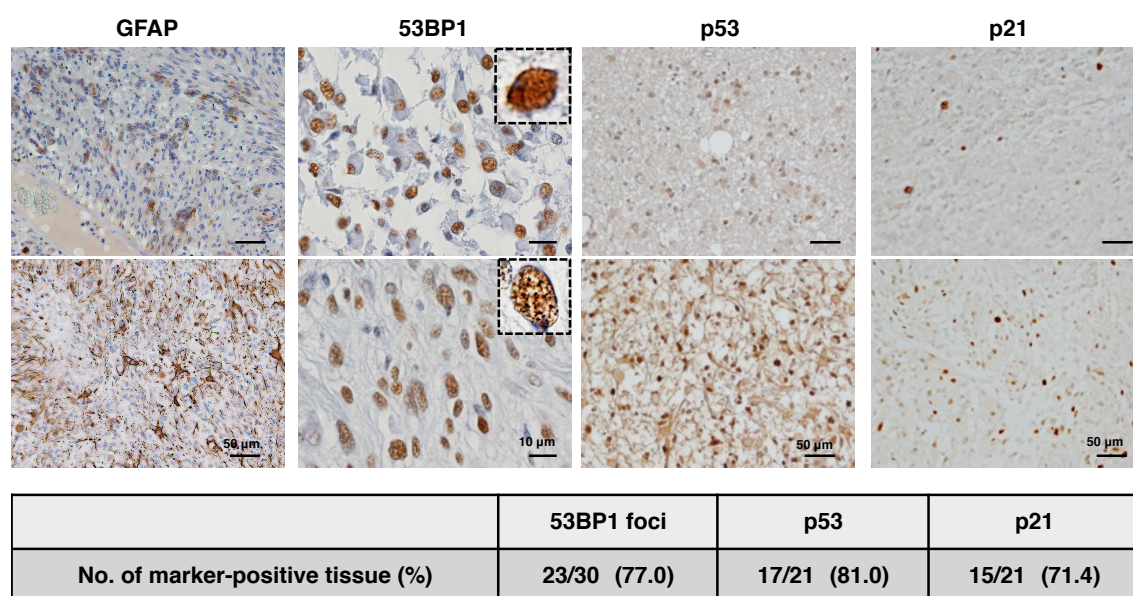


Figure 2J. Immunohistochemistry of human GBM tissue microarray (21–30 patient-derived tissue sections on each slide) with the indicated antibodies. Upper and lower panels represent the tissue sections with low and high frequencies of positive cells, respectively. The table at the bottom shows the frequency (percentage in parenthesis) of the marker-positive tissues in all samples. In the case of 53BP1, the presence of multiple nuclear foci (inset in the lower panel of 53BP1) was judged as marker-positive.

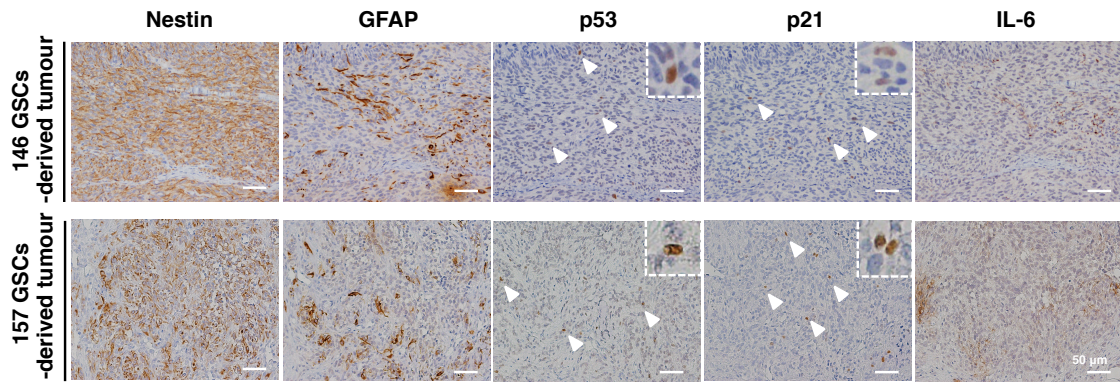


Figure 2K. Immunohistochemistry of GSC-derived xenograft tumours with the indicated antibodies. Each panel shows the same area derived from multiple slices of a tumour. Arrowheads indicate the antigen-positive cells.

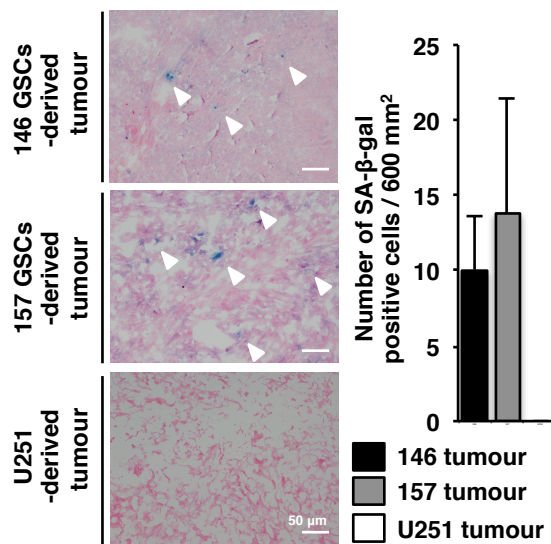


Figure 2L. SA-β-gal staining of xenograft tumours derived from GSCs and U251, a p53-deficient glioma cell line.

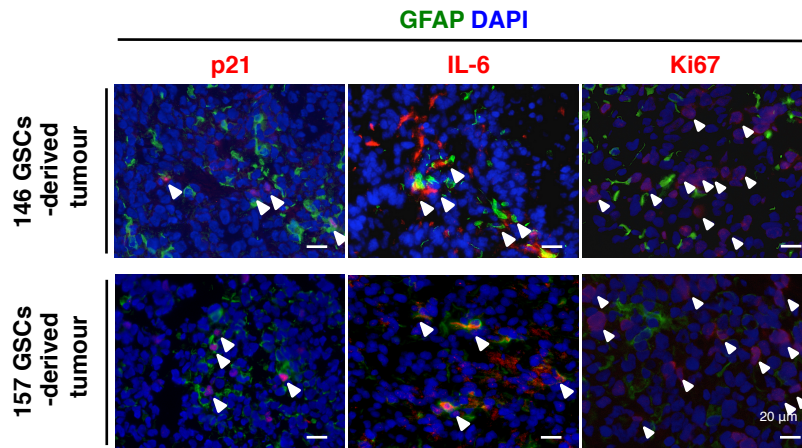


Figure 2M. Immunofluorescence staining of GSC-derived tumours with the indicated antibodies. Arrowheads indicate p21+ / GFAP+, IL-6 +/GFAP+, or Ki67+/GFAP- cells. DNA was counterstained with DAPI (blue).

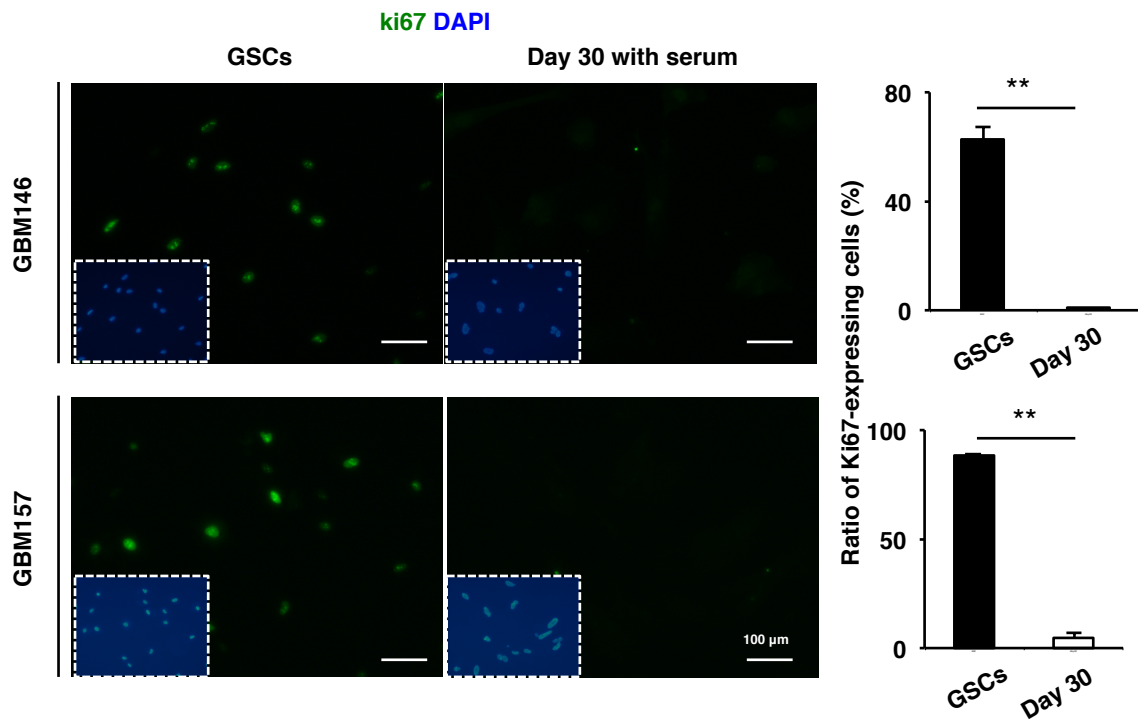


Figure 2N. Immunofluorescence staining of Ki67 in GSCs and NSGCs. Graphs on right indicates quantitation of the Ki67-expressing cells ($n > 90$). Error bars, standard deviations. Statistical evaluations were performed using the Welch t test. **, $P < 0.005$.

考察

本章は、前章で認められた細胞増殖停止 NSGCs が、自発的に細胞老化を引き起こし、GBM の腫瘍組織中に存在することを強く示唆した。

本章では、NSGCs の細胞老化を SA- β -gal 活性 (Fig.2A)、染色体数 (Fig.2B)、老化関連マーカーの発現 (Fig.2C,D,E) によって評価した。以前まで、細胞老化は、pH6.0 の弱酸性条件下で、老化細胞特異的に活性化する SA- β -gal の活性による解析で十分であった⁴⁶。しかし、最近では、SA-beta gal の活性が、様々なストレス下において観察されており、老化細胞特異的でない現象であることがわかっている⁴⁷。現在、SA-beta gal 活性は、細胞老化の誘導に必要なこともわかっており、リソソーム β -ガラクトシダーゼの発現や集積増加により引き起こされていることが報告されている⁴⁸。

細胞老化は、一般的に、p53/p21 経路ならびに/もしくは p16/RB 経路で引き起こされる^{49,50}。NSGCs の細胞増殖停止までの過程で p16 の発現が確認されなかったことから (Fig.2E)、NSGCs は、p53/p21 経路を介して老化が誘導された可能性が高い。GBM 患者のうち p53 の変異・欠損が 30%であるのに対し、p16 の欠損は 90%以上で認められる⁵¹⁻⁵³。GBM146 と GBM157 も p16 を欠損もしくは変異していたことが原因で、p16 の発現が観察されなかった可能性がある。また、p53 と p21 の発現は、血清添加後上昇したことから (Fig.2C)、NSGCs の細胞老化だけでなく、GSCs から NSGCs への分化の制御機構にも寄与しているかもしれない。

Fig.2F, G, H, I で示されるように、NSGCs の細胞老化という現象が、血清だけでなく BMP4 を用いた異なる分化誘導実験系においても誘起されることがわかった。BMP は、正常な神経幹細胞の増殖や分化を制御することで知られており、GBM でも同様の働きを示すことが明らかとなっている^{19,45}。BMP は、BMP の受容体 (BMPR) に結合し、Smad のシグナルを介して BMP 特異的遺伝子転写の活性もしくは抑制を誘導する。BMP の中でも、BMP4 が、GSCs から NSGCs へ一番強い分化作用をもつといわれている。その他に BMP2 と BMP7 も GSCs の分化を誘導する因子として報告されている^{54,55}。最近では、生体内/外で、GSCs

で観察される代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor: mGluR) 3 の発現抑制が、BMP4 シグナルの増加を促進させ、分化誘導シグナルの向上やがん細胞の増殖抑制につながることを報告されている⁵⁶⁻⁵⁸。そのため、GBM 新規治療法として、mGluR3 のブロックと BMP4 のデリバリーの併用効果が期待されている。一方、FBS による GSCs の分化誘導メカニズムについては、未だによくわかっていない。おそらく、BMP4 が、FBS による分化誘導因子の一つである可能性は高い。血清の中でも、FBS は、ヒト由来を含む他の血清に比べ、BMP4 が多く含まれている⁵⁹。BMP4 単独に比べ、FBS による GSCs の分化誘導傾向は強いため、FBS による分化において BMP2 や BMP7 も寄与しているかもしれない。現状、BMP4 と FBS のどちらの実験系で得た細胞が、*in vivo* の NSGCs の性質に近似しているか比較している論文はない。しかし、本研究において、両方の実験系で得た NSGCs が、*in vivo* の NSGCs の性質を反映していることは確かである。

一般的に、がん幹細胞は、細胞増殖停止 (G0 期) の状態であり、分化したがん細胞が、高い増殖を示すことが報告されている⁶⁰。一方、Fig.2M で示されるように、GBM の場合、増殖マーカー Ki67 の発現が、GFAP 陽性 NSGCs 以外の細胞で高頻度に確認された。つまり、がん幹細胞もしくは前駆細胞のような未分化細胞が、分化細胞よりも高い増殖を有していることが示唆される。*in vitro* の実験でも (Fig.2N)、Ki67 は、GSCs で高い発現を示し、NSGCs で顕著に減少した。*in vitro* と *in vivo* の間で相関もみられ、Ki67 が、GSC マーカーとしてなりうる可能性が考えられる。一方、本研究では、NSGCs を GFAP のみのアストロサイトマーカーで評価している。NSGCs は、オリゴデンドロサイトやニューロンのマーカーも発現していることが報告されており、上記を立証するためには、GFAP 以外の NSGCs マーカーと Ki67 との発現比較をすることは必須である。

SASP は、全ての細胞で必ずしも認められる現象ではない。正常な脳では、老化したアストロサイトが、SASP を示す傾向にある^{61,62}。Fig.2 M で示されるように、GBM 組織中の GFAP 陽性 NSGCs は、高頻度に SASP 因子である IL-6

を含む老化関連マーカーを発現した。本研究で見いだされた老化現象ならびに SASP 因子の分泌は、NSGCs の中で GFAP 陽性アストロサイト特異的な性質の可能性も考えられる。つまり、分化したがん細胞は、それぞれ異なる働きを担っており、GSCs からアストロサイトへの分化抑制が、がんを弱体化する標的になりうるかもしれない。しかし、未だに、GSCs が、どういったメカニズムで、どの細胞に分化するかはよくわかっていない。正常な分化過程と違い、GBM の分化過程は無秩序な印象である。今後、GSCs の分化メカニズムの解明が、GBM 治療の鍵となるかもしれない。

第3章 老化 NSGCs における血管新生関連液性因子の放出

要約

近年、老化細胞が、senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる液性因子を放出し、がんの発生や進展に寄与していることが報告されている⁶³。前章で認められた老化 NSGCs も、SASP 因子のようなタンパク質を放出し、GBM の悪性化に寄与しているかもしれない。本章で、私は、網羅的遺伝子発現解析の結果、老化 NSGCs が、GSCs や分化 NSGCs に比べ、SASP 因子の一種である血管内皮増殖因子 VEGF-C の遺伝子を高く発現していることがわかった。さらに、老化 NSGCs は、SASP 因子であり GBM の血管新生に強く関わる VEGF-C、VEGF-A、IL-6、IL-8 を細胞外に豊富に放出していた。以上の結果から、老化 NSGCs は、細胞外に血管新生関連液性因子を豊富に放出していることが明らかとなった。

3-1. 老化 NSGCs における血管新生関連遺伝子の発現

目的

老化 NSGCs は、正常組織中に存在する老化細胞と同様に SASP のような液性因子を放出している可能性がある。網羅的な遺伝子発現解析を行い、老化 NSGCs が、どのような液性因子関連遺伝子を高く発現しているかを明らかにする。

材料・方法

GeneChipマイクロアレイ解析

GSCs、分化NSGCs（血清添加7日目）、老化NSGCs（血清添加30日目）のそれぞれのRNAを、RNeasy kit（Qiagen）により抽出し、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 array（Affymetrix）でラベル化し、解析した。

GeneSpring GX software（Agilent Technologies）によりデータの標準化、統合解析、Gene Ontology解析を行った。マイクロアレイのデータは、アクセス番号GSE74304でGene Expression Omnibus database

（www.ncbi.nlm.nih.gov/geo）に保管されている。

結果

GSCs、分化 NSGCs、老化 NSGCs の網羅的な遺伝子発現を検証した。老化 NSGCs では、GSCs や分化 NSGCs に比べ 10 倍以上高い遺伝子（プローブ数）が、それぞれ GBM146 と GBM 157 において 303 と 401 個であった (Fig.3A)。その後、液性因子に絞り上位から並べたところ、GBM146 ならびに GBM 157 では、血管内皮増殖因子である VEGF-C が、1 位と 2 位を占めていることがわかった (fold change 114.56 と 78.09; Table 1 と Fig.3B)。また、10 倍以上の遺伝子を Gene Ontology 解析にて分類してみると、血管新生関連遺伝子群が豊富に含まれていることがわかった (Fig.3C)。

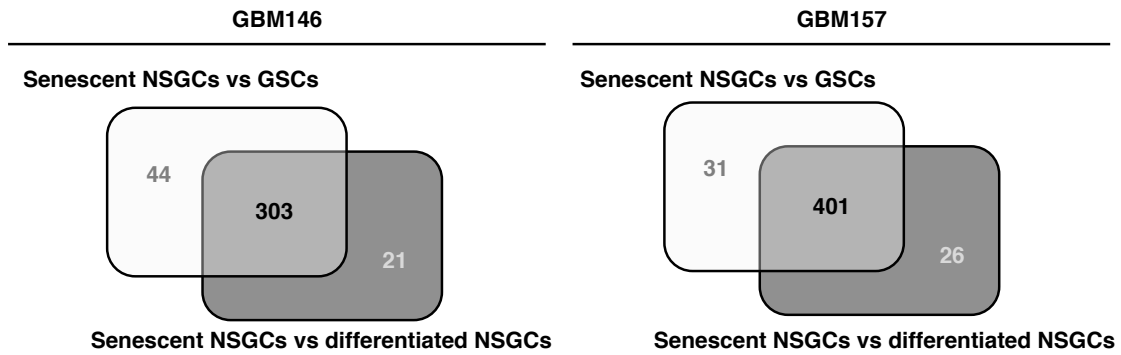


Figure 3A. Gene expression profiles were compared between senescent NSGCs (day 30 after serum exposure) and GSCs, as well as between senescent NSGCs and differentiated/pre-senescent NSGCs (day 7 after serum exposure). The expression of 303 and 401 probes was upregulated > 10-fold in the senescent GBM146 and GBM157 cells, respectively.

GBM146				GBM157					
Gene	Fold change	Gene	Fold change	Gene	Fold change	Gene	Fold change	Gene	Fold change
GPNMB	281.70	TRIM22	12.99	ASPN	681.84	ANKS1B	23.70	FAT4	11.51
VEGFC	114.56	PDGFD	12.97	GPNMB	280.24	KCTD4	21.72	CCL2	11.43
TMEM47	40.14	SCG2	12.60	EDIL3	184.02	PAPPA	21.67	STC2	11.43
LUM	34.88	ADAMTS5	12.56	TMEM47	119.96	COL5A2	20.60	GBP3	11.10
DKK1	32.20	KIAA0367	12.15	DAB2	91.20	HTR2B	19.45	ARHGAP29	11.04
FGF7	30.00	GBP1	11.46	PSG5	88.83	BACE2	19.11	LOX	10.91
SCG5	29.75	PLXDC2	11.34	FGF7	78.41	NNMT	18.28	HLF	10.90
KRTAP2-1	28.83	MYL1	11.11	VEGFC	78.09	MYOZ2	18.25	C9ORF95	10.67
ASPN	28.59	FGL2	11.03	ABI3BP	72.84	CFH	17.08	IGFBP7	10.66
RGS5	26.39	FAT4	10.88	LUM	50.77	PCDH8	16.46	THBS2	10.58
DKK2	25.25	MFAP5	10.54	IL13RA2	50.45	EPAS1	15.42	NAP1L3	10.52
COL6A3	24.76	C4ORF32	10.46	CD36	43.81	TYRP1	14.94	PSG9	10.48
DAB2	23.66	EVI2A	10.38	MYL1	41.41	OGN	14.38	CCDC80	10.42
RGS4	22.92	APCDD1	10.20	KRTAP2-1	41.31	PDE1A	14.38	FRZB	10.31
F2RL2	19.82			KIAA1199	37.14	ROR1	14.23	NFKBIZ	10.26
IL13RA2	18.49			KIAA0367	33.12	NTN4	14.07	EDN1	10.22
SERPINI1	18.15			F2RL2	30.35	RGS5	13.98	PSG6	10.07
KIAA1199	18.09			SCG5	30.05	SERPINI1	13.79		
CDH13	16.46			MOXD1	29.98	ADAMTS5	13.60		
ANKS1B	15.78			RGS4	29.22	OMG	13.45		
COL1A1	15.22			DKK1	28.99	EVI2A	12.43		
CFH	15.03			PCSK5	27.10	HSPB8	12.41		
AK5	14.96			COL3A1	26.02	ITPR1	12.14		
KCTD4	14.40			ECM2	25.63	PDGFD	11.73		
IL8	14.30			ITGA11	24.89	SLITRK1	11.70		

Table 1. Signal intensities of all the 10-fold-upregulated gene probes in senescent NSGCs compared with GSCs and differentiated NSGCs. Fold change indicates the ratio of signal intensity of senescent NSGCs to the average of GSCs and differentiated NSGCs.

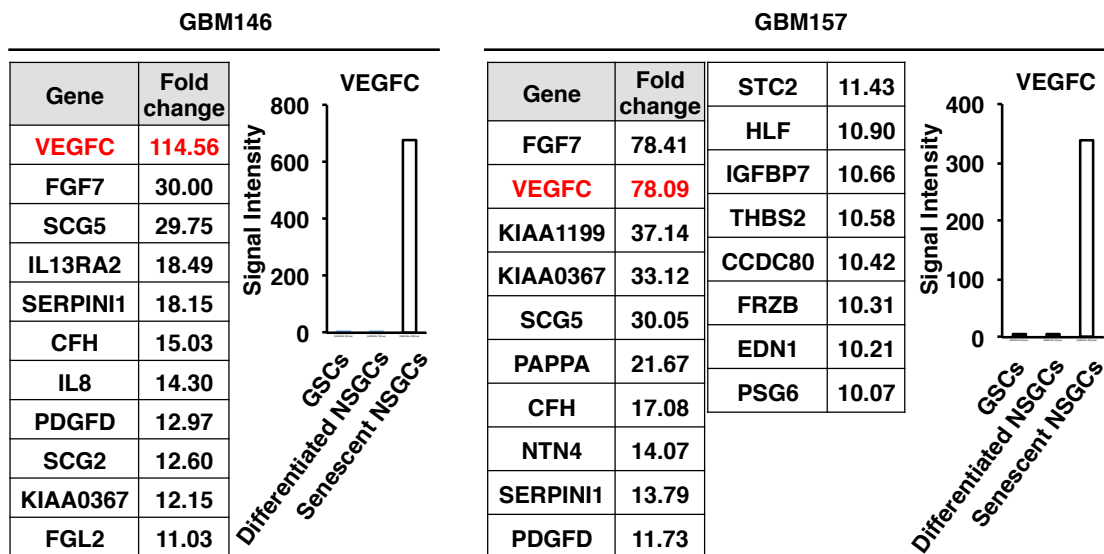


Figure 3B. Signal intensities of the 10-fold-upregulated gene probes (only secretory protein-coding genes) in senescent NSGCs compared with GSCs and differentiated NSGCs. Fold change indicates the ratio of signal intensity of senescent NSGCs to the average of GSCs and differentiated NSGCs.

GBM146				
GO Accession	GO term	Count in Selection (%)	Count in Total (%)	P-value
GO:0001568	Blood vessel development	24 (10.3)	446 (2.5)	4.15E-9
GO:0001944	Vasculature development	25 (10.8)	475 (2.6)	3.03E-9
GO:0001525	Angiogenesis	18 (7.8)	288 (1.6)	4.20E-8
GO:0048514	Blood vessel morphogenesis	19 (8.2)	373 (2.1)	4.29E-7
GO:0035295	Tube development	22 (9.5)	640 (3.5)	3.20E-5

GBM157				
GO Accession	GO term	Count in Selection (%)	Count in Total (%)	P-value
GO:0001944	Vasculature development	26 (8.6)	475 (2.6)	1.64E-7
GO:0001568	Blood vessel development	23 (7.6)	446 (2.5)	2.40E-6
GO:0035295	Tube development	27 (8.9)	640 (3.5)	1.34E-5

Figure 3C. Gene ontology (GO) analysis of the senescent NSGC-associated genes ($P < 0.005$, Fisher's exact test). Enriched GO categories include those of angiogenesis.

3-2. 老化 NSGCs における血管新生関連液性因子の放出

目的

GeneChip マイクロアレイ解析の結果から、GBM146 と GBM157 の両方の老化 NSGCs が、共通して、VEGF-C を高く発現していることがわかった。次に老化 NSGCs が細胞外に VEGF-C を放出しているのかを明らかにする。さらに、GBM の血管促進因子として知られている VEGF-A や主要な SASP 因子の放出も検証する。

材料・方法

酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA)

血清添加 0、5、20、30 日の細胞をそれぞれ血清添加培地下で 5 日間培養した。その後、Human Quantikine ELISA kits (R&D Systems) の IL-6 (D6050)、CXCL8/IL-8 (D8000C)、VEGF (DVE00)、VEGF-C (DVEC00) にて、それぞれの培地上清に含まれるタンパク質を検出した。

結果

GBM146 と GBM157 の老化 NSGCs (day 30) は、GSCs (day 0) や分化 NSGCs (day 5) に比べ、VEGF-C を豊富に放出していることがわかった (Fig.3D)。また、老化 NSGCs は、VEGF-C と同様に血管促進因子として知られている VEGF-A を最も豊富に放出していた⁶⁴ (Fig.3D)。さらに、主要な SASP 因子であり、GBM で高い発現が確認されている IL-6、IL-8、IL-18 の分泌量も検証した。IL-6 と IL-8 は、老化 NSGCs で豊富に放出されていることが観察された^{63,65} (Fig.3D)。一方、IL-18 は、全ての CM 中で検出されなかった (Fig.3E)。

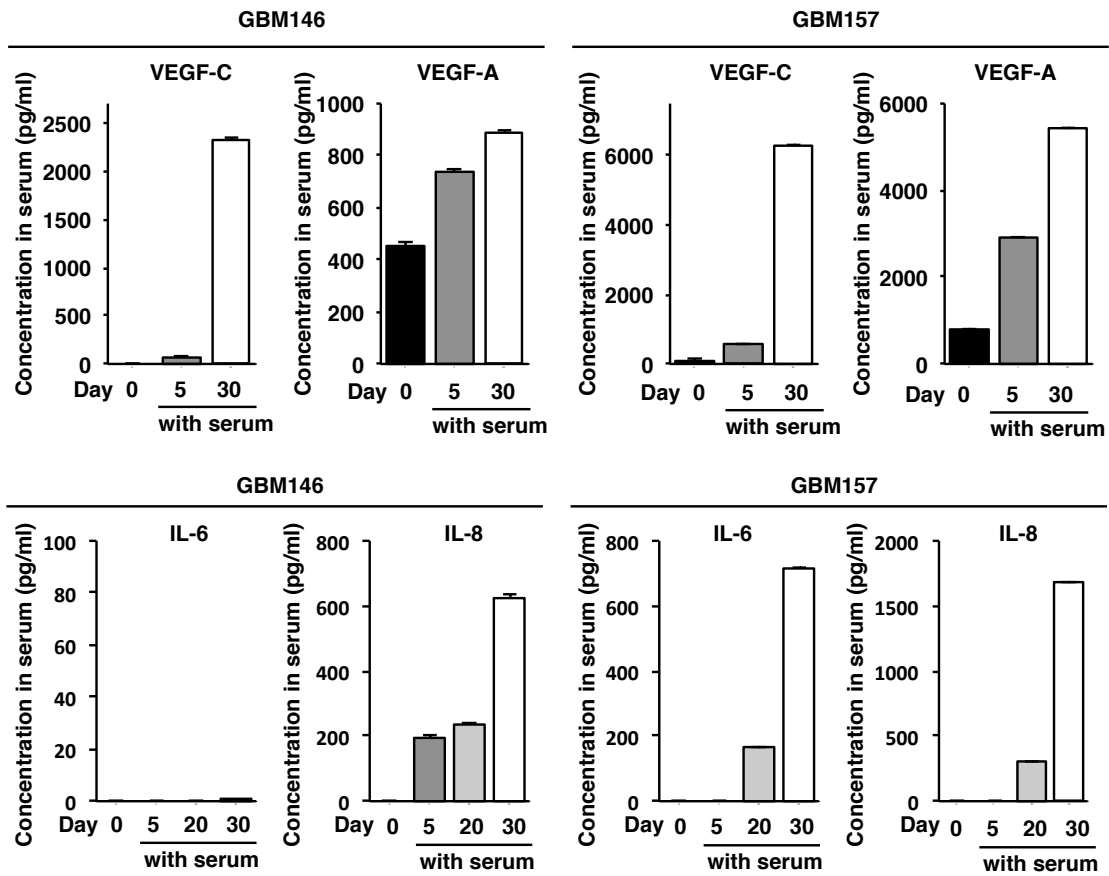


Figure 3D. ELISA detection of VEGF-C and -A and IL-6 and -8 secretion in the conditioned medium (CM) of GBM146 and GBM157 cells precultured in serum-containing medium for the indicated time periods. For CM preparation, cells were seeded and cultured in serum-containing medium for 5 days, and the culture supernatants were collected.

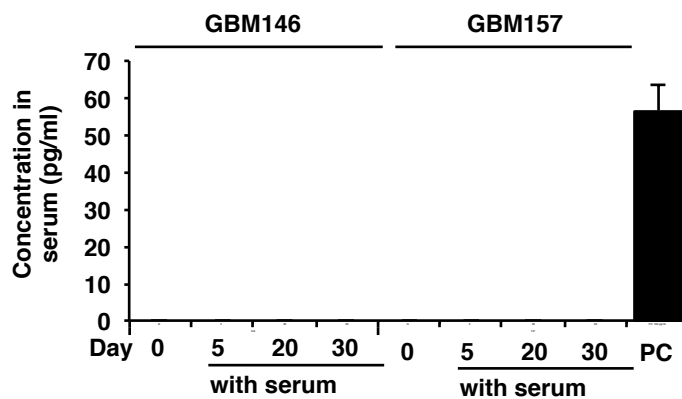


Figure 3E. ELISA detection of IL-1 β in the conditioned medium (CM) of

GBM146 and GBM157 cells indicated as Fig.3D. PC: the CM with 100 pg/ml recombinant IL-1 β as positive control.

考察

本章で、老化 NSGCs が、SASP であり GBM の血管新生に強く関わる液性因子 (VEGF-C、VEGF-A、IL-6、IL-8) を細胞外に豊富に分泌していることがわかった。

細胞老化は、腫瘍を抑制する重要なメカニズムである⁶⁶⁻⁶⁸。しかし、近年の研究により、老化細胞が SASP と呼ばれる液性因子を介した細胞非自立的制御により、腫瘍の発生や進展を促進させていることがわかってきた^{63,65}。SASP の一種である血管内皮増殖因子 VEGF は、VEGF-A、B、C、D と placental growth factor の 5 つのファミリーに分けられ、正常やがん組織中で主に血管新生を促進させる役割を担っている⁶⁴。この中でも、VEGF-A は、GBM の血管新生に強く関わることが知られている。VEGF-A は、GBM 中の血管新生だけでなく、GSCs からの血管内皮細胞への分化においても必須の因子である^{69,70}。一方、臨床の場では、VEGF-A 阻害剤ベバシズマブが、GBM に対して期待されていたほど作用していないことが報告されている。様々な理由が提唱される中、ベバシズマブが、GBM 中の VEGF-C の発現を増加させ、腫瘍血管への反応を促進させることが報告されている⁷¹。つまり、VEGF-C が、VEGF-A を介した血管新生の抑制を補っている可能性が考えられる。VEGF-C は、GBM の組織中で高い発現が確認されており^{72,73}、がん細胞種の中でも GBM で多く分泌される傾向にある⁷⁴。また、VEGF-C のレセプターである VEGFR-3 は、GBM の血管系細胞で発現しており⁷²、グリオーマの悪性度との相関も認められている⁷⁵。VEGF-C は、血管新生との強い関わりが報告されており^{76,77}、VEGF-A と同様に、GBM 中の血管系への影響は多大であるといえる。さらに、最近、脳の中樞神経にリンパ管の存在が同定された⁷⁸。リンパ管新生は、他のがんにおいて、浸潤や転移を促進することが報告されている⁷⁹。VEGF-C は、一般的に、リンパ管新生に強く関わる因子であることから、GBM の中で血管新生とリンパ管新生の両方を促進させることで、GBM の悪性化に寄与している可能性が考えられる。

主要な SASP 因子である IL-6 と IL-8 も、GBM 患者の予後不良と相関があり^{80,81}、GBM 中の血管を促進させることが報告されている^{63,82}。IL-6 は、細胞内

の Stat3 シグナルを介して VEGF の転写活性を直接制御していることも報告されている⁸³。一方、GBM で高い発現が確認され、GBM の血管新生促進因子としても報告されている IL-18 は、老化 NSGCs を含む CM 中には観察されなかった⁸⁴⁻⁸⁶。過去の知見のように、IL-18 は、主に骨髄由来単球やミクログリアからの分泌物質なのかもしれない^{87,88}。

第 4 章 老化 NSGCs による血管新生の促進と GSC 由来腫瘍形成の向上

要約

本章で、私は、老化 NSGCs の培養上清下で血管内皮細胞の増殖が向上することを明らかにした。血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) の中和実験の結果から、老化 NSGCs による血管内皮細胞の増殖亢進は、一部 VEGF を介して引き起こされていることも明らかとなった。また、*in vivo* 実験で、GSCs と老化 NSGCs を共移植した場合、GSCs の単独移植に比べ、腫瘍組織内部の血管内皮細胞マーカー CD31 の発現が増加することがわかった。さらに、GBM 中の血管新生促進が、GSCs の腫瘍形成にどう影響するかを明らかにするため、同条件下で GSCs 単独移植、分化 NSGCs と GSCs の共移植、老化 NSGCs と GSCs の共移植を行った。結果、老化 NSGCs と GSCs の共移植群において、腫瘍形成率が上がり、腫瘍の大きさも増大した。以上の結果から、老化 NSGCs は、血管新生を促進させ、GSC 由来の腫瘍形成を助力していることが示唆された。

4-1. 老化 NSGCs による血管内皮細胞の増殖促進

目的

老化 NSGCs が、SASP を含む液性因子を介して血管内皮細胞の増殖を促進させるかを明らかにする。また、その増殖促進が認められた場合、VEGF が主要な促進因子であるかを明らかにする。

材料・方法

HBMEC と HUVEC の増殖アッセイ

ヒト脳微小血管内皮細胞 HBMEC (ACBRI376; Cell Systems, Kirkland, WA, USA) とヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC (C2517A; Lonza, Basel, Switzerland) を、それぞれコラーゲンでコートされた 24-ウェルプレート (1.5×10^4 個の細胞/ウェル) と通常の 24-ウェルプレート (1.5×10^4 個の細胞/ウェル) に撒いた。上記の細胞を、通常の培養液、もしくは、老化 NSGCs (血清添加 30 日目の細胞) から得られた培養上清下で 5 日間培養した。5 日目に、細胞数を計測した。ウェルチの t 検定 *, $P < 0.005$; **, $P < 0.001$ によって統計学的評価を行った。

抗 VEGF 抗体を用いた中和実験

HBMEC と HUVEC を、24-ウェルプレート (1.5×10^4 個の細胞/ウェル) に撒き、老化 NSGCs (血清添加 30 日目の細胞) から得られた培養上清下で 5 日間培養した。同時に、 $1 \mu\text{g/mL}$ mouse anti-VEGF (MAB293; R&D systems) と、コントロールとして $1 \mu\text{g/mL}$ mouse anti-IgG2b (MAB004; R&D systems) の抗体を添加した。統計学的評価を、ウェルチの t 検定 *, $P < 0.01$; **, $P < 0.005$ によって行った。

結果

老化 NSGCs の培養上清 (CM) 下での HUVEC は、コントロールである通常の培養液下に比べ、2-3 倍増加することがわかった (Fig.4A)。次に、VEGF が老化 NSGCs による細胞増殖促進の主要な因子であるか明らかにするため、GBM146 の老化 NSGCs の CM 中に全ての VEGF ファミリーの働きを抑圧する抗 VEGF 抗体を添加した。結果、老化 NSGCs の CM 下で抗 VEGF 抗体を添加した HUVEC の数は、コントロールの培養液のみとほぼ同等の値まで減少した (Fig.4B)。さらに、老化 NSGCs による脳由来血管内皮細胞 HBMEC の増殖促進効果も同様に検証したところ、HBMEC は、老化 NSGCs の CM 下で、コントロールに比べ 3-4 倍増加することがわかった (Fig.4C)。VEGF による HBMEC の増殖促進効果の検証に関しても、HUVEC と同様に検証したところ、老化 NSGCs の CM 下の HBMEC の増殖は、抗 VEGF 抗体を添加することで抑えられたが、その抑制に有意差は認められなかった (Fig.4D)。今回は、3 つのサンプルで実験を行い、3 回繰り返した結果を総合したデータであるが、さらに n 数を増やすことで、有意差が得られると考える。以上の結果から、老化 NSGCs は、一部 VEGF を介して、血管内皮細胞の増殖を促進することがわかった。

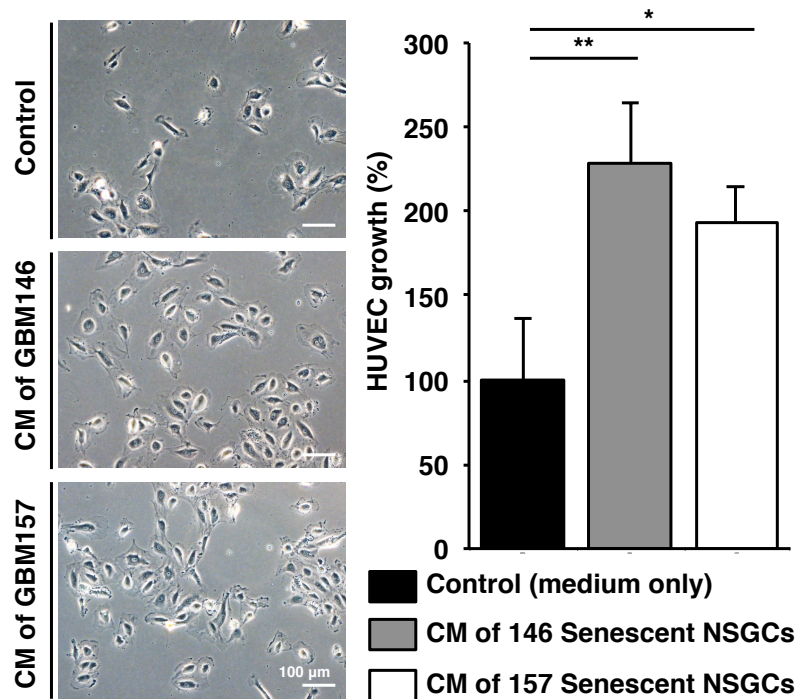


Figure 4A. Promotion of HUVEC growth by the CM of senescent NSGCs (day 30 after serum exposure), compared with the control medium with serum. Error bars, standard deviations. Statistical evaluations were performed using the Welch *t* test. *, $P < 0.005$; **, $P < 0.001$.

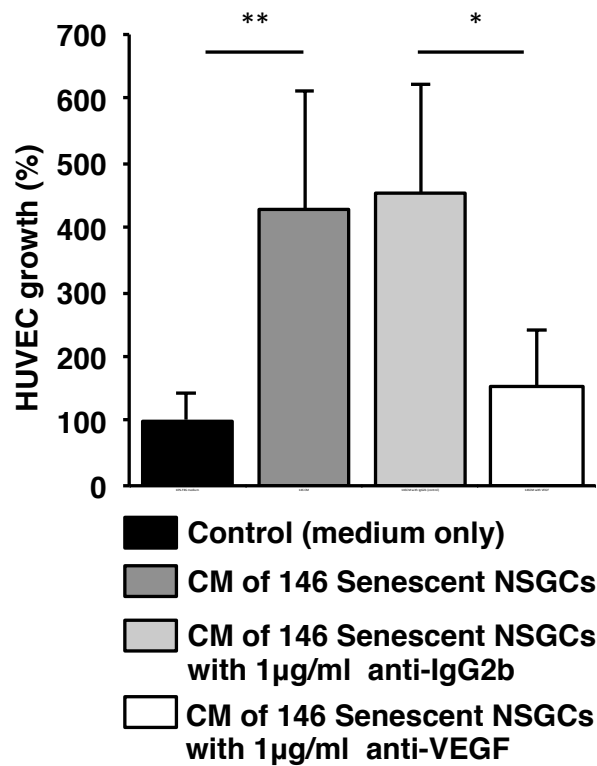


Figure 4B. Neutralization assay of 1 µg/mL anti-VEGF antibody on HUVEC growth under the CM of GBM146 senescent NSGCs. Error bars, standard deviations. Statistical evaluations were performed using the Welch *t* test. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.005$.

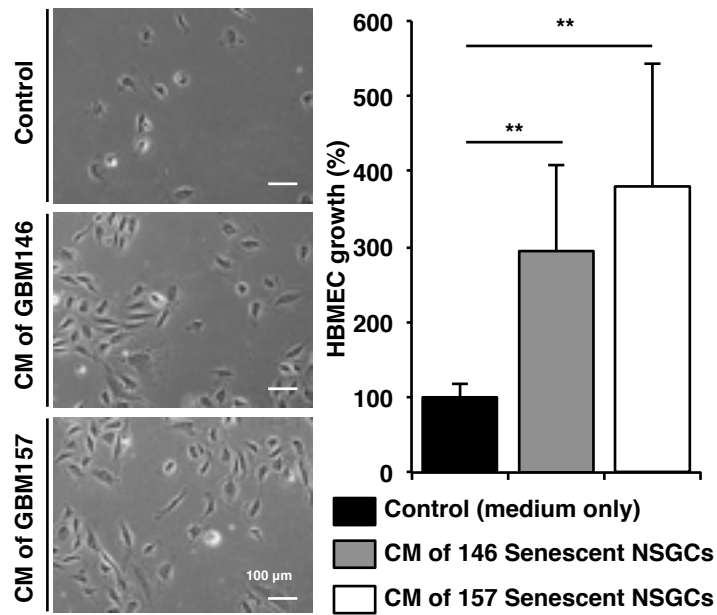


Figure 4C. Promotion of HBMEC growth by the CM of senescent NSGCs (day 30 after serum exposure), compared with the control medium with serum. Error bars, standard deviations. Statistical evaluations were performed using the Welch t test. **, $P < 0.001$.

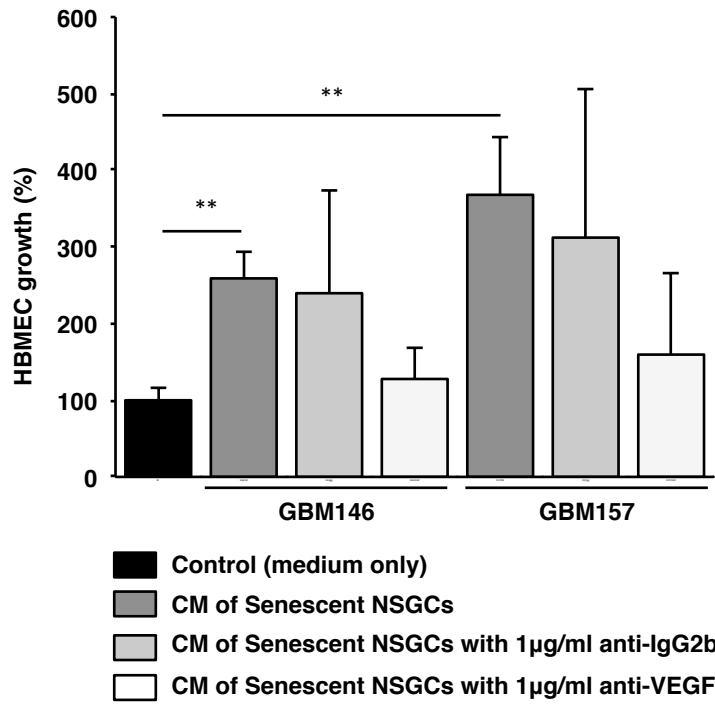


Figure 4D. Neutralization assay of 1 µg/mL anti-VEGF antibody on HBMEC growth under the CM of senescent NSGCs. Error bars, standard deviations. Statistical evaluations were performed using the Welch *t* test. **, $P < 0.005$.

4-2. 老化 NSGCs による腫瘍内の血管新生促進

目的

in vivo 下で老化 NSGCs が GBM 中の血管新生の促進に寄与しているのかを明らかにする。

材料・方法

マウスの異種移植実験

6 週目のメス・免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) の皮下に GSCs (5×10^6 個の細胞, 1×10^7 個の細胞, 2×10^7 個の細胞, 4×10^7 個の細胞) 単独移植、もしくは、GSCs (5×10^6 個の細胞) と老化 NSGCs (5×10^6 個の細胞もしくは 1×10^7 個の細胞) を共移植した。GBM146 GSCs の単独移植による腫瘍形成は、最低 4×10^7 個の細胞が必要であった。上記の細胞は、マトリゲル (1:1, Corning) でまぜてから移植した。評価時に腫瘍の大きさを揃えるべく、 $400\text{-}500\text{mm}^3$ になった時点で腫瘍をマウスから取り出した。

組織化学染色

第 2 章 (2-3) に記した方法で下記の抗体を用いて染色した: rabbit anti-CD31 (ab28364, 1:50; abcam), mouse anti-Ki67 (M7240, 1:50; DAKO); rabbit anti-SOX2 (3579S, 20 ng/mL, Cell Signaling Technology)。

結果

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と組織化学染色を用いて、GSCs 単独移植と GSCs と老化 NSGCs 共移植の 2 つの群の腫瘍を比較した。血管内皮細胞マーカー CD31 の染色を行ったところ、腫瘍内部での CD31 発現細胞の頻度が、単独移植群に比べ、GBM146 と GBM157 両方の共移植群で増加することがわかった (Fig.4E)。特に、腫瘍の内部に存在する CD31 陽性細胞で構築された管腔の増加が目立った。HE 染色後の組織像を比較した結果、GBM146 の場

合、共移植群では、単独移植群に比べ、ネクロシスの領域が広範囲で認められた (Fig.4E)。増殖マーカーKi67の染色では、GBM157の共移植群で、Ki67発現細胞の頻度が顕著に増加していることがわかった (Fig.4E)。以上の結果から、老化 NSGCs は、GBM146 と GBM157 組織中で、血管新生を促進していることが示唆された。また、老化 NSGCs は、血管新生に限らず、GBM の悪性化に関与する因子にも寄与していることが明らかとなった。

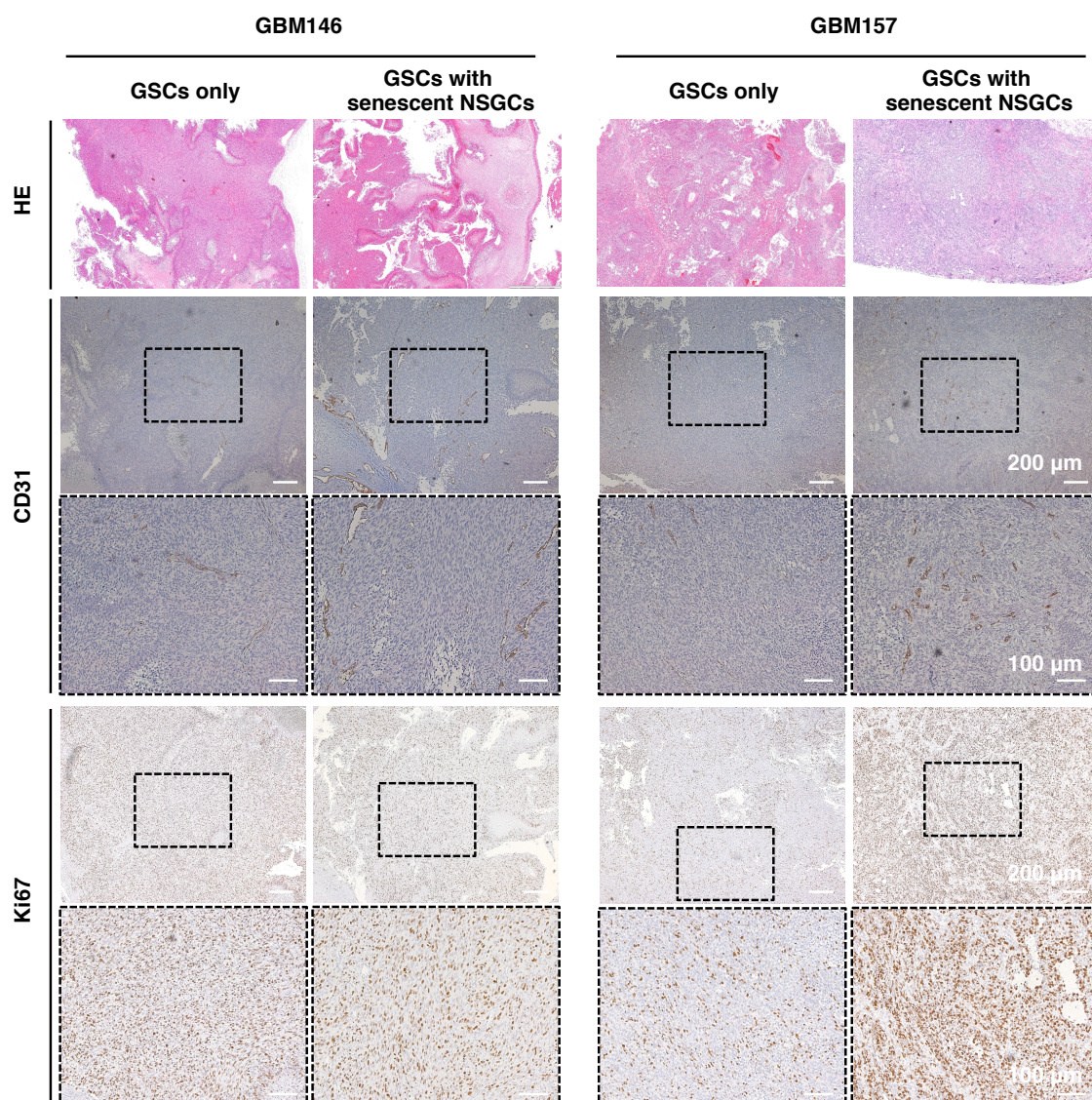


Figure 4E. Immunohistochemistry of CD31 and Ki67 in GSC derived xenograft and GSC and senescent NSGC derived xenograft. The photos are

tumour xenografts of GSCs (4×10^7 cells) alone or GSCs and senescent NSGCs (5×10^6 cells plus 1×10^7 cells) in GBM146, and GSCs (1×10^7 cells) alone or GSCs and senescent NSGCs (5×10^6 cells plus 5×10^6 cells) in GBM157.

4-3. 老化 NSGCs による GSC 由来腫瘍形成の向上

目的

老化 NSGCs が血管新生を促進させることが示唆された。そこで、その現象が、GSC 由来の腫瘍形成率と腫瘍の大きさに影響を及ぼすかを明らかにする。

材料・方法

マウスの異種移植実験

移植群と移植細胞数は、1. GSCs 単独 (5×10^6 個の細胞)、2. GSCs (5×10^6 個の細胞) と分化 NSGCs (1×10^7 個の細胞: GBM146 と GBM157 は、それぞれ血清添加 15 日目と 10 日目の細胞)、3. GSCs (5×10^6 個の細胞) と老化 NSGCs (1×10^7 個の細胞: GBM146 と 157 どちらも血清添加 30 日目の細胞) である。上記の細胞を、マトリゲル (1:1, Corning) で混ぜてから 6 週目のメス・免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) の皮下に移植した。移植してから 3 ヶ月後、腫瘍の大きさを測定した ($TV = (L \times W^2) / 2$)。

結果

GSCs 単独、GSCs と分化 NSGCs、GSCs と老化 NSGCs の 3 つの群のそれぞれの腫瘍形成率を比較したところ、GBM146 では、老化 NSGCs と GSCs の共移植群のみで腫瘍の形成が認められた (Fig.4F)。さらに、腫瘍の大きさに関しては、GBM146 と GBM157 両方において、老化 NSGCs との共移植群の腫瘍が、他の群に比べ、顕著に増大した (Fig.4F)。以上の結果から、老化した NSGCs (分化 NSGCs ではない) が、GSC 由来の腫瘍形成能を向上させることがわかった。

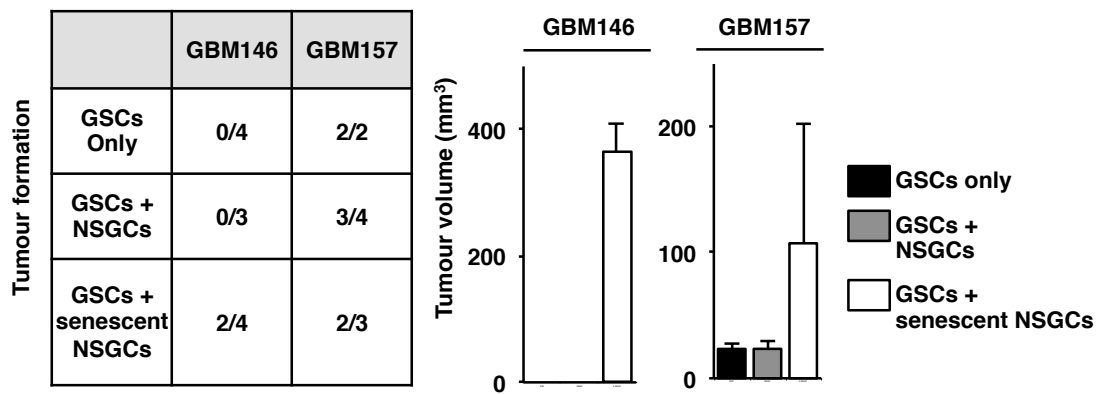


Figure 4F. Promotion of GSC-derived tumour formation by senescent but not differentiated NSGCs. GSCs with or without differentiated/senescent NSGCs were injected subcutaneously into NOD/SCID mice. After three months, tumour formation and its volume were evaluated.

考察

本章では、老化 NSGCs が、血管新生を促進させ、GSC 由来の腫瘍形成に積極的に助力していることが明らかとされた。

Fig.4B,D で示されたように、老化 NSGCs は、VEGF を介して HUVEC や一部の HBMEC の増殖を促進させることがわかった。一方、VEGF-C を特異的に抑圧できる抗体が世の中に存在しないため、老化 NSGCs が豊富に分泌する VEGF-C が、血管内皮細胞を増殖する主要な促進因子であるか見いだせなかった。抗 VEGF-A 抗体やベバシズマブにより、老化 NSGCs による増殖促進効果をどれだけ抑制できるか検証し、その抑制効果の結果と本研究結果を比較することで、VEGF-C による血管内皮細胞増殖に対する影響度合を確認できるであろう。また、VEGF-C をノックダウンもしくはノックアウトした老化 NSGCs の CM を用いた血管内皮増殖促進効果の検証も良い。

GBM は、腫瘍組織中の血管網やネクロシス領域が多い腫瘍ほど悪性度が高い⁸⁹。また、増殖マーカー Ki67 は、グリオーマの予後不良と相関していることが報告されている⁹⁰。Fig.4E の結果から、老化 NSGCs が、GBM の悪性化に関わる因子（血管網、ネクロシス領域、増殖細胞）に強く寄与していることがわかった。一方、VEGF、IL-6、IL-8 が、GSCs の性質を制御していることが複数の論文で報告されている中⁹¹⁻⁹⁵、本研究では、老化 NSGCs が GSCs に寄与していることを示すデータは得られなかった。*in vivo* では、GSCs 単独移植と GSCs と老化 NSGC の共移植で組織中の SOX2 陽性細胞の頻度を比較したが、大きな差は認められなかった（データは示さず）。*in vitro* では、老化 NSGCs と共培養した GSCs の増殖やテモゾロミドに対する感受性の検証を行ったが、通常の培養下で培養された GSCs と大差なかった（データは示さず）。おそらく、近年の単一細胞レベルでの解析により GSCs の不均一性が明らかにされているように^{5,33,96}、本研究で用いた GSCs は、SASP の受容体を保持しておらず、老化 NSGCs による影響が認められなかった可能性が考えられる。また、Fig4E. の現象と共に、老化 NSGCs との共移植群由来腫瘍中の VEGF の発現増加を確認するため、組織化学染色を行ったが、染色を確認することが出来なかった。

以前から液性因子の染色の難しさは痛感しており、さらなる条件検証が必要であると考える。

過去の知見から、GSCs は、GBM 中の血管系をサポートする内皮細胞に分化することが明らかとされている^{69,70}。老化 NSGCs が豊富に分泌する VEGF-A が GSCs から血管内皮細胞への分化に必要であることも報告されていることから、Fig4.E で認められた CD31 の発現は、GSC 由来の可能性も考えられる。そこで、CD31 発現細胞が、マウス由来なのか、もしくはがん由来なのかを明らかにするため、GBM157 GSC 単独移植の腫瘍組織を対象に予備的な検証を行った。マウスを特異的に認識する抗 CD31 抗体とヒトとマウス両方を認識する抗 CD31 抗体を共染色したところ、CD31 を発現する細胞は、マウス特異的抗体で大半を占めていたが、一部、未染色が確認された（データを示さず）。特に、マウス特異的 CD31 の発現は、小さな管腔を形成する細胞で非発現だった。GSCs は、低酸素状態を好み、腫瘍内部に存在する傾向にあることから^{32,33}、Fig.4E で示された老化 NSGCs と GSCs の共移植腫瘍組織の内部で増加した管腔を構築する CD31 発現細胞は、マウス由来のものではなく、GSC 由来の可能性が示唆された。

総括

GSCs は、多くの特性が解明され、現在、GBM の進行ならびに再発の主犯格と考えられている。一方、NSGCs は、細胞増殖に限りがあり腫瘍形成能を有していないことから、GBM の悪性化には寄与していないという考えが一般的である。しかしながら、実際、NSGCs の性質についての詳細はわかっていない。そこで、私は、NSGCs の性質ならびに GBM 中の NSGCs の役割を解明することにした。

第 1 章では、GSCs が、血清により NSGCs に分化し、テロメラーゼ活性消失後、テロメア複製問題に伴い細胞増殖停止に至ることがわかった。本章の IF-FISH の結果からは (Fig.1H)、テロメア短縮によるテロメア機能不全が、NSGCs の細胞増殖停止の誘因であるか明確な答えを出すことができなかった。テロメア機能不全に至ったテロメアは、非常に短いため、IF-FISH で認識できなかった可能性も考えられる。また、Fig.2C で示されるように、血清添加 5 日目の時点で発現増加が確認された老化誘導因子 p53、p21、脱リン酸化 RB が、NSGCs の細胞増殖停止 (老化) の引き金となった可能性も考えられる。しかし、老化誘導因子を発現増加した NSGCs は、すぐに老化に至らず、テロメア長の短縮に伴い老化を誘導した。テロメラーゼは、テロメア RNA 構成因子である TERC (Telomerase RNA component) とテロメア逆転写酵素触媒構成因子 TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) によって構成されている。TERC は、常に発現が維持されていることから、テロメラーゼ活性は、TERT の発現により制御されている³¹。現在、TERT の転写促進因子として c-myc や wnt シグナルが報告されており、抑制因子として、p53、p21、脱リン酸化 RB が知られている。つまり、p53 を含む老化誘導因子の発現増加が、直接的ではなく、TERT の発現を抑制し、テロメア維持機構を破綻させることで間接的に NSGCs の老化を誘導した可能性が考えられる。NSGCs で人為的に TERT の高発現や老化誘導因子の抑制を誘導し、この推測が正しいかを確認したい。しかし、TERT は、GSCs の性質を維持する重要な因子であることが報告されており⁹⁷、NSGCs の段階で TERT を発現すると GSCs へ脱分化する可能性も考えられる。

第2章では、前章で認められた細胞増殖停止 NSGCs が、自発的に細胞老化を引き起こし、GBM の腫瘍組織中にも存在していることが強く示唆された。本研究で用いた GSCs は、遺伝子発現パターンや患者の年齢、治療応答などの臨床所見で区別される3種類のGBMの亜型の中で proneural (PN) type に位置する^{98,99}。現在、私は、PN以外のtypeのどの亜型でも共通してNSGCsの細胞老化という現象が認められるのかを明らかにするため、悪性度が最も高い mesenchymal (MES) type の GSCs を用いて本研究と同様の実験を行っている。現状、私は、MES type GSCs が、FBS では分化されないことを確認しているため、BMP4 を用いた分化誘導実験系に変更し検証中である。

腫瘍組織中に存在する GFAP 陽性アストロサイトが、がん細胞由来なのか、それとも周囲の細胞をリクルートした結果得られた細胞なのかは、蛍光たんぱく質を導入した GSCs を移植することで確認できる。また、GSC 由来腫瘍組織をヒト特異的 GFAP 抗体で染色し確認することも可能である。しかし、本研究は、皮下移植で得られた腫瘍組織を用いていることもあり (Fig.2K,M)、腫瘍組織中の GFAP 陽性細胞が、周辺にある GFAP 陽性細胞をリクルートして得られたとは考えにくく、がん細胞由来である可能性が高い。

第3章では、老化 NSGCs が、SASP であり GBM の血管新生促進因子として知られている液性因子を細胞外に豊富に分泌していることがわかった。以前から、GBM 組織中で IL-6、IL-8、VEGF ファミリーの発現は観察されていたが、本研究結果により、それら因子が、老化 NSGCs から放出される SASP という形で GBM に存在していることが示唆された。臨床 GBM 中で実際に同様の現象が起きているのかを明らかにするため、今後、臨床標本から得られた NSGCs を対象に老化や SASP 関連マーカーの発現を確認するべきである。また、GeneChip 解析の結果から、GBM146 と GBM157 の老化 NSGCs で高い遺伝子発現を示した繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF7) は、他のがん種の発生や進行ならびに血管内皮増殖因子の発現に寄与していることが報告されていることから¹⁰⁰⁻¹⁰²、血管新生の促進を含め GBM において重要な役割を担っている可能性が示唆される。

第4章では、老化 NSGCs が、血管新生を促進させ、GSC 由来の腫瘍形成に積極的に助力していることが明らかとされた。本研究では、免疫不全マウスを用いた異所移植実験により得られた結果だが、現在、同所移植実験により実際に脳の環境下でも同様の結果が得られるかを検証中である。ヌードマウスを用いた同所移植実験では、腫瘍の生着が確認されなかった。腫瘍部位にマクロファージの残存が確認されたことから、さらに重度の免疫不全を煩った NOD/SCID マウスを用いた実験を現在行っている最中である。

ミクログリアは、グリア細胞の一種であり、脳内でマクロファージのような貪食の働きを担う。ミクログリアは、GBM の性質を制御することで知られており、VEGF や IL-6、IL-8 を含む SASP 因子により、腫瘍内にリクルートされることが報告されている¹⁰³⁻¹⁰⁵。異所移植実験である皮下の周辺にはミクログリアが存在していないため、同所移植実験で得られた腫瘍組織を用いて、老化 NSGCs が、SASP 因子を介してミクログリアのリクルートに寄与しているのか興味深い。

第1章から4章までの結果を振り返り、GBM の悪性度は、分化や老化という性質に相関性がある可能性が示唆された。臨床組織と GSC 由来の腫瘍組織を比較すると、臨床組織では GFAP 陽性細胞の数の多さと共に、老化関連マーカーを発現する細胞も多く認められた。一方、GSC 由来の腫瘍組織では、GFAP 発現細胞と老化マーカー発現細胞どちらも顕著に少なかった。また、GBM146 と GBM157 GSCs の性質を比較すると、GBM157 GSCs は、*in vivo* と *in vitro* 下で分化や老化に移行する強い傾向があり、それと同時に腫瘍の生着率が格段に高い。今後、臨床組織中の分化や老化細胞の存在頻度とその腫瘍組織由来 GBM 患者の臨床所見を比較することや GBM146 や GBM157 に加えて他の症例患者由来 GSCs で実験検証をすることで、分化や老化という性質と GBM の悪性化との相関に関する明確な答えが見いだせるであろう。分化や老化マーカーが、GBM の予後不良マーカーになりうるかもしれない。

がん細胞の老化現象というのは、腫瘍抑制機構として働くことが一般的に考えられている⁶⁶⁻⁶⁸。しかしながら、本研究結果により、細胞老化を引き起こし

たがん細胞は、SASP を介した細胞非自立的制御により、がんの悪性を助力するという、老化したがん細胞の裏の顔が明らかとなった。本研究では、自然に引き起こされるがん細胞の老化と、がんの悪性化におけるその老化の寄与が解明されたが、治療で引き起こされる人為的ながんの老化（治療誘導老化）においても、同様の性質やがんへの影響が認められるかもしれない。治療後のがんは、一時、腫瘍の退縮が認められるものの、その後、再発が多々観察される。つまり、治療誘導老化ならびに GBM のような自然老化のがん細胞は、がんの中で蓄積することで、再発や転移を含むがんの悪性度を促進させる働きを担っている可能性が考えられる。もし、そうなのであれば、GBM に限らず、他種のがんにおいても、本研究結果ならびにその結果を踏まえた治療法の開発は非常に重要な意味をもつ。現在、私は、老化 NSGCs が分泌する多くの液性因子から一つの因子に絞ることは難しく、単一の標的では治療効果がうすいと見え、老化 NSGCs 自身や老化機構を標的にした治療法に期待を寄せている。例えば、老化細胞特異的除去（細胞死）システム構築の開発である。正常な細胞さえも、老化し、体内に蓄積すると、がんの発生や疾患を促進させる。つまり、老化したがん細胞を治療標的にすることは、正常細胞への副作用なしでがんを弱体化する方法であり、さらに、がんの発生予防にもつながる一石二鳥の方法なのかもしれない。また、細胞死誘導がん治療の推奨も考えている。がんの治療薬は、腫瘍の中で細胞老化もしくは/ならびに細胞死を誘導する。もし、老化誘導がん治療が、細胞死誘導治療に比べ再発頻度が高いことを立証できれば、細胞死を誘導する治療が一つの有用な選択の目安になる。

近年、NSGCs が、腫瘍の根源となるがん幹細胞への可塑性を有していることが報告された¹⁰⁶。NSGCs は、GSCs に脱分化し、本研究で見いだされた老化を介して腫瘍微小環境を構築するという 2 つの面で GBM の悪性化に積極的に助力していることが考えられる。本研究は、GBM における NSGCs の生物学的重要性ならびに GBM のような難治がんの治療的介入として重要な知見である。

参考文献

1. Friedman, H.S., Kerby, T. & Calvert, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* **6**, 2585-2597 (2000).
2. Ferrara, N., Hillan, K.J. & Novotny, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 328-335 (2005).
3. Furnari, F.B., *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* **21**, 2683-2710 (2007).
4. Stupp, R., *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**, 459-466 (2009).
5. Patel, A.P., *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**, 1396-1401 (2014).
6. Nakano, I. Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. *J Neurosurg* **122**, 324-330 (2015).
7. Alves, T.R., *et al.* Glioblastoma cells: a heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life Sci* **89**, 532-539 (2011).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
9. Singh, S.K., *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
10. Vescovi, A.L., Galli, R. & Reynolds, B.A. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* **6**, 425-436 (2006).
11. Cheng, L., Bao, S. & Rich, J.N. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* **80**, 654-665 (2010).
12. Chen, J., *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **488**, 522-526 (2012).
13. Wan, F., *et al.* Association of stem cell-related markers and survival in astrocytic gliomas. *Biomarkers* **16**, 136-143 (2011).

14. Campos, B., *et al.* Expression and regulation of AC133 and CD133 in glioblastoma. *Glia* **59**, 1974-1986 (2011).
15. Miyazaki, T., *et al.* Telomestatin impairs glioma stem cell survival and growth through the disruption of telomeric G-quadruplex and inhibition of the proto-oncogene, c-Myb. *Clin Cancer Res* **18**, 1268-1280 (2012).
16. Nakano, I., *et al.* Siomycin A targets brain tumor stem cells partially through a MELK-mediated pathway. *Neuro Oncol* **13**, 622-634 (2011).
17. Bao, S., *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760 (2006).
18. Singh, S.K., *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-5828 (2003).
19. Piccirillo, S.G., *et al.* Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* **444**, 761-765 (2006).
20. Celia-Terrassa, T., *et al.* Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest* **122**, 1849-1868 (2012).
21. Mateo, F., *et al.* SPARC mediates metastatic cooperation between CSC and non-CSC prostate cancer cell subpopulations. *Mol Cancer* **13**, 237 (2014).
22. Long, H., *et al.* CD133+ ovarian cancer stem-like cells promote non-stem cancer cell metastasis via CCL5 induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget* **6**, 5846-5859 (2015).
23. Chaffer, C.L., *et al.* Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7950-7955 (2011).
24. Mashima, T., *et al.* Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci* **100**, 1556-1562 (2009).
25. Seimiya, H., Muramatsu, Y., Ohishi, T. & Tsuruo, T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer*

- Cell* **7**, 25-37 (2005).
26. Seimiya, H., Muramatsu, Y., Smith, S. & Tsuruo, T. Functional subdomain in the ankyrin domain of tankyrase 1 required for poly(ADP-ribosyl)ation of TRF1 and telomere elongation. *Mol Cell Biol* **24**, 1944-1955 (2004).
 27. Lee, J., *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**, 391-403 (2006).
 28. Hirashima, K., *et al.* Telomere length influences cancer cell differentiation in vivo. *Mol Cell Biol* **33**, 2988-2995 (2013).
 29. Meeker, A.K., *et al.* Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol* **160**, 1259-1268 (2002).
 30. Allsopp, R.C., *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10114-10118 (1992).
 31. Nakamura, T.M., *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955-959 (1997).
 32. McCord, A.M., *et al.* Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol Cancer Res* **7**, 489-497 (2009).
 33. Seidel, S., *et al.* A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* **133**, 983-995 (2010).
 34. Suva, M.L., *et al.* EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res* **69**, 9211-9218 (2009).
 35. Abdouh, M., *et al.* BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J Neurosci* **29**, 8884-8896 (2009).
 36. Orzan, F., *et al.* Enhancer of Zeste 2 (EZH2) is up-regulated in malignant gliomas and in glioma stem-like cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* **37**, 381-394 (2011).
 37. Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460 (1990).
 38. Shay, J.W. & Wright, W.E. Telomerase activity in human cancer. *Curr*

- Opin Oncol* **8**, 66-71 (1996).
39. Holt, S.E. & Shay, J.W. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* **180**, 10-18 (1999).
 40. Huffman, K.E., Levene, S.D., Tesmer, V.M., Shay, J.W. & Wright, W.E. Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J Biol Chem* **275**, 19719-19722 (2000).
 41. Seimiya, H., *et al.* Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-199. *Mol Cancer Ther* **1**, 657-665 (2002).
 42. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J. & Peeper, D.S. The essence of senescence. *Genes Dev* **24**, 2463-2479 (2010).
 43. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* **4**, 1798-1806 (2009).
 44. Johmura, Y., *et al.* Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol Cell* **55**, 73-84 (2014).
 45. Gonzalez-Gomez, P., Anselmo, N.P. & Mira, H. BMPs as therapeutic targets and biomarkers in astrocytic glioma. *Biomed Res Int* **2014**, 549742 (2014).
 46. Dimri, G.P., *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367 (1995).
 47. Yang, H.S. & Hinds, P.W. Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype. *Mol Cell* **11**, 1163-1176 (2003).
 48. Lee, B.Y., *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195 (2006).
 49. Ben-Porath, I. & Weinberg, R.A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 961-976 (2005).
 50. Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513-522 (2005).
 51. Ohgaki, H., Schauble, B., zur Hausen, A., von Ammon, K. & Kleihues,

- P. Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours. *Virchows Arch* **427**, 113-118 (1995).
52. Bogler, O., Huang, H.J., Kleihues, P. & Cavenee, W.K. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* **15**, 308-327 (1995).
53. Ichimura, K., Schmidt, E.E., Goike, H.M. & Collins, V.P. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* **13**, 1065-1072 (1996).
54. Chirasani, S.R., *et al.* Bone morphogenetic protein-7 release from endogenous neural precursor cells suppresses the tumorigenicity of stem-like glioblastoma cells. *Brain* **133**, 1961-1972 (2010).
55. Persano, L., *et al.* BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1alpha stability and MGMT expression. *Cell Death Dis* **3**, e412 (2012).
56. Teh, J. & Chen, S. mGlu Receptors and Cancerous Growth. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* **1**, 211-220 (2012).
57. Arcella, A., *et al.* Pharmacological blockade of group II metabotropic glutamate receptors reduces the growth of glioma cells in vivo. *Neuro Oncol* **7**, 236-245 (2005).
58. Ciceroni, C., *et al.* Type-3 metabotropic glutamate receptors negatively modulate bone morphogenetic protein receptor signaling and support the tumorigenic potential of glioma-initiating cells. *Neuropharmacology* **55**, 568-576 (2008).
59. Herrera, B. & Inman, G.J. A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol* **10**, 20 (2009).
60. Li, L. & Bhatia, R. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res* **17**, 4936-4941 (2011).
61. Salminen, A., *et al.* Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci* **34**, 3-11 (2011).
62. Bitto, A., *et al.* Stress-induced senescence in human and rodent

- astrocytes. *Exp Cell Res* **316**, 2961-2968 (2010).
63. Coppe, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**, 99-118 (2010).
 64. Goel, H.L. & Mercurio, A.M. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* **13**, 871-882 (2013).
 65. Coppe, J.P., *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **6**, 2853-2868 (2008).
 66. Michaloglou, C., *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720-724 (2005).
 67. Collado, M., *et al.* Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642 (2005).
 68. Feldser, D.M. & Greider, C.W. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* **11**, 461-469 (2007).
 69. Ricci-Vitiani, L., *et al.* Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**, 824-828 (2010).
 70. Wang, R., *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* **468**, 829-833 (2010).
 71. Grau, S., *et al.* Bevacizumab can induce reactivity to VEGF-C and -D in human brain and tumour derived endothelial cells. *J Neurooncol* **104**, 103-112 (2011).
 72. Jenny, B., *et al.* Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas. *J Pathol* **209**, 34-43 (2006).
 73. Xu, Y., *et al.* Collaborative overexpression of matrix metalloproteinase-1 and vascular endothelial growth factor-C predicts adverse prognosis in patients with gliomas. *Cancer Epidemiol* **37**, 697-702 (2013).
 74. Laakkonen, P., *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* **67**, 593-599

- (2007).
75. Grau, S.J., *et al.* Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade. *J Neurooncol* **82**, 141-150 (2007).
 76. Tammela, T., *et al.* Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* **454**, 656-660 (2008).
 77. Tvorogov, D., *et al.* Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization. *Cancer Cell* **18**, 630-640 (2010).
 78. Louveau, A., *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**, 337-341 (2015).
 79. Christiansen, A. & Detmar, M. Lymphangiogenesis and cancer. *Genes Cancer* **2**, 1146-1158 (2011).
 80. Salmaggi, A., *et al.* Intracavitary VEGF, bFGF, IL-8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* **62**, 297-303 (2003).
 81. Sasaki, A., Ishiuchi, S., Kanda, T., Hasegawa, M. & Nakazato, Y. Analysis of interleukin-6 gene expression in primary human gliomas, glioblastoma xenografts, and glioblastoma cell lines. *Brain Tumor Pathol* **18**, 13-21 (2001).
 82. Yeung, Y.T., McDonald, K.L., Grewal, T. & Munoz, L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *Br J Pharmacol* **168**, 591-606 (2013).
 83. Loeffler, S., Fayard, B., Weis, J. & Weissenberger, J. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* **115**, 202-213 (2005).
 84. Lu, T., Tian, L., Han, Y., Vogelbaum, M. & Stark, G.R. Dose-dependent cross-talk between the transforming growth factor-beta and interleukin-1 signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4365-4370 (2007).
 85. Sharma, V., Dixit, D., Koul, N., Mehta, V.S. & Sen, E. Ras regulates

- interleukin-1beta-induced HIF-1alpha transcriptional activity in glioblastoma. *J Mol Med (Berl)* **89**, 123-136 (2011).
86. Yoshino, Y., *et al.* Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF secretion in human malignant glioma cells. *Int J Oncol* **29**, 981-987 (2006).
87. Zhang, L., *et al.* S100B attenuates microglia activation in gliomas: possible role of STAT3 pathway. *Glia* **59**, 486-498 (2011).
88. Zhang, L., *et al.* Stat3 inhibition activates tumor macrophages and abrogates glioma growth in mice. *Glia* **57**, 1458-1467 (2009).
89. Mao, P., *et al.* Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8644-8649 (2013).
90. Montine, T.J., *et al.* Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* **34**, 674-678; discussion 678-679 (1994).
91. Hamerlik, P., *et al.* Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J Exp Med* **209**, 507-520 (2012).
92. Xu, C., Wu, X. & Zhu, J. VEGF promotes proliferation of human glioblastoma multiforme stem-like cells through VEGF receptor 2. *ScientificWorldJournal* **2013**, 417413 (2013).
93. Chiou, G.Y., *et al.* Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma. *Mol Cell* **52**, 693-706 (2013).
94. Jin, X., *et al.* Interferon regulatory factor 7 regulates glioma stem cells via interleukin-6 and Notch signalling. *Brain* **135**, 1055-1069 (2012).
95. Wang, H., *et al.* Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells* **27**, 2393-2404 (2009).
96. Meyer, M., *et al.* Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 851-856 (2015).
97. Beck, S., *et al.* Telomerase activity-independent function of TERT

- allows glioma cells to attain cancer stem cell characteristics by inducing EGFR expression. *Mol Cells* **31**, 9-15 (2011).
98. Phillips, H.S., *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**, 157-173 (2006).
 99. Verhaak, R.G., *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98-110 (2010).
 100. Narita, K., *et al.* Keratinocyte growth factor induces vascular endothelial growth factor-A expression in colorectal cancer cells. *Int J Oncol* **34**, 355-360 (2009).
 101. Cho, K., *et al.* Enhanced expression of keratinocyte growth factor and its receptor correlates with venous invasion in pancreatic cancer. *Am J Pathol* **170**, 1964-1974 (2007).
 102. Yasuhara, T., *et al.* FGF7-like gene is associated with pericentric inversion of chromosome 9, and FGF7 is involved in the development of ovarian cancer. *Int J Oncol* **26**, 1209-1216 (2005).
 103. Jantaratnotai, N., Choi, H.B. & McLarnon, J.G. ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. *BMC Cancer* **9**, 442 (2009).
 104. Kerber, M., *et al.* Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. *Cancer Res* **68**, 7342-7351 (2008).
 105. Zhang, J., *et al.* A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis* **33**, 312-319 (2012).
 106. Flavahan, W.A., *et al.* Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci* **16**, 1373-1382 (2013).

略語

GBM, glioblastoma; GSC, glioma stem cell; NSGC, non-stem glioma cell; FBS, fetal bovine serum; BMP4, bone morphogenetic protein 4; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; HBMEC, human brain microvascular endothelial cell; SASP, senescence-associated secretory phenotype; VEGF, vascular endothelial growth factor; CM, conditioned medium; telomere dysfunction-induced foci, TIFs.

謝辞

本研究は、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻がん分子標的治療学分野研究室において、清宮啓之先生の丁寧かつ熱心な御指導のもとに行わせて頂きました。心より御礼申し上げます。当研究室の岡部幸子先生には、本研究論文の実験のデータ取得に御助力ならびに実験操作の御指導をして頂き大変お世話になりました。右田敏郎先生には、本研究で得られた腫瘍組織に対する病理学的視点からの御意見ならびに実験のデータ取得に御助力頂きました。馬島哲夫先生には、研究を進める上で有意義な御意見ならびに御指導を頂きました。吉田喜香先生には、マウス室の使用法からマウスの飼育法まで、また腫瘍組織の染色法を指導して頂きました。吉田喜香先生と川上隆兵君には、マウス飼育の御協力をお願いした際、いつも快く引き受けて下さいました。岡本啓治先生と長谷川大記君には、*in vitro* の蛍光免疫染色の方法を丁寧に御指導して頂きました。水谷アンナ先生には、マイクロアレイ解析に関して、大変参考になる御助言を頂きました。本研究を進めるにあたり、多くの御指導、御助言を頂きました当研究室の皆様へ心から御礼申し上げます。

京都薬科大学の中田晋先生には、マウス脳同所移植実験の方法を直々に教えて頂き、厚く御礼申し上げます。審査過程において貴重な御指摘や御助言をして下さいました井上純一郎先生、渡邊学先生、宮島篤先生、後藤由季子先生に御礼申し上げます。アラバマ大学バーミングサム校の中野伊知郎先生には、本研究で使用しました GBM146 と GBM157 の GSCs を提供して頂き、また研究を進めるにあたり有意義な御指導を頂き、御礼申し上げます。シンシナティ小児病院メディカルセンターの小池博之先生には、研究ならびに論文を作成する上で非常に有意義な御助言をして頂き、御礼申し上げます。最後になりますが、東京大学名誉教授であらせられます吉田光昭先生には、折に触れて大変有意義な御助言や激励を頂き、心よりお礼申し上げます。

両親には惜しみない生活面でのサポートに対し感謝の念に堪えません。皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げ、謝辞にかえさせていただきます。