

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏名 大内 梨江

<序論>

神経膠芽腫 (glioblastoma multiforme: 以下、GBM) は、グリア細胞から発生する脳腫瘍の一種であり、最も悪性度が高いグレード IV に分類される。GBM では、異常な血管分布や広範囲の浸潤が観察され、手術による腫瘍摘出後、放射線や化学療法を用いても再発が高頻度で認められる。そのため、GBM 患者の平均生存期間は 2 年と、予後が非常に悪く、有効な治療法の開発は急務である。

GBM は、様々な細胞によって構築された不均一な細胞集団である。その細胞集団の中には、神経膠腫幹細胞 (glioma stem cells: 以下、GSCs) と呼ばれるがん幹細胞の存在が認められている。GSCs は、自己複製能、腫瘍形成能、多分化能を有しており、治療抵抗性も認められることから、GBM の発生・進展・再発の根本原因であると考えられている。一方、GSCs から分化して得られる非がん幹細胞 (non-stem glioma cells: 以下、NSGCs) は、GSCs の性質と異なり、細胞増殖に限りがあり、腫瘍形成能を有していない。そのため、NSGCs は、GBM の嵩という考えのみで、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。近年、脳腫瘍以外の他のがん種において、非がん幹細胞が、がん幹細胞への脱分化能や上皮間葉転換を介した転移能を獲得するなどの報告がなされ、がん治療における非がん幹細胞の重要性が見直されてきている。そこで、我々は、GBM における NSGCs の存在意義を解き明かすため、NSGCs の性質ならびに GBM 中での役割を解明することにした。

<結果>

① 血清添加による GSCs の幹細胞性の消失および NSGCs への分化

本研究では、アラバマ大学の中野伊知郎先生から頂いた 2 名の GBM 患者由来の GSCs を用いた。我々は、スフェア培養法と呼ばれる無血清・増殖因子添加条件の培地

で、GSCs の性質を維持し、GSCs の分化誘導によく用いられる FBS（以下、血清）により、GSCs から NSGCs への分化誘導を試みた。血清添加後の GSCs の幹細胞性を評価するため、我々は GSCs および血清添加 5 日目と 20 日目の細胞を対象に、GSC マーカーの発現解析を行った。結果、全てのマーカーは、血清添加 5 日目で減少し、20 日でほぼ消失することがわかった。また、スフェアアッセイの結果、血清添加 20 日目の細胞は、GSCs の性質に特徴的なスフェア能を有していなかった。以上の結果から、GSCs は、血清添加により、幹細胞性を消失し、培養 20 日目には NSGCs に分化することがわかった。

② NSGCs におけるテロメラーゼ活性消失による末端複製問題と細胞老化

我々は、GSCs から NSGCs への分化過程での細胞増殖変化を明らかにするため、ピュレーションダブルリング (PD) 解析を行った。結果、血清添加後の GSCs は NSGCs へと分化していく過程で、4-7 回の細胞分裂を起こし、血清添加後 20-30 日目で増殖を停止した。細胞増殖停止した細胞は、一般的な老化細胞で観察される、細胞質に富んだ肥大化した形態を示していた。我々は、NSGCs の老化状態について評価をするため、老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA- β -gal) 活性解析、プロピジウムイオダイド染色による DNA 細胞周期解析、老化関連マーカーの発現解析を行った。結果、いずれの解析からも血清添加 30 日目の細胞は、老化細胞で認められる性質が確認され、増殖停止した NSGCs は、細胞老化を引き起こしていることが明らかとなった。また、テロメアリポート増幅プロトコル (TRAP) 解析とテロメアサザンプロット解析を用いてテロメアの再生酵素であるテロメラーゼの活性とテロメア長の測定を行なった結果、テロメラーゼ活性が血清添加 10 日目で消失し、細胞増殖低下に伴いテロメアの短縮が認められた。以上の結果から、NSGCs は、テロメラーゼ活性消失によるテロメア複製問題を起こし、細胞老化に至ることがわかった。

③ GBM 腫瘍組織中の老化 NSGCs の存在

我々は、生体外で認められた老化 NSGCs が生体内においても確認されるかを明らかにするため、GBM 患者由来の腫瘍組織および GSCs を免疫不全 (NOD/SCID) マウス皮下に移植し形成された異種移植片を対象として老化関連マーカーの組織化学染色を行った。その結果、老化関連マーカーを発現している細胞は、腫瘍組織の広範囲で観察された。また、異種移植片を対象にした NSGCs マーカーとの共染色では、NSGCs と老化関連のマーカーを共発現している細胞が認められた。以上の結果から、GBM 腫瘍組織中に老化 NSGCs が存在していることが示唆された。

④ 老化 NSGCs における血管新生関連因子の放出

近年、正常組織中の老化細胞が、senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる液性因子を分泌し、発がんやがんの進展に寄与する報告がなされている。我々は、網羅的な遺伝子発現解析である GeneChip マイクロアレイ解析を用いて、GSCs、分化 NSGCs (老化前)、老化 NSGCs の発現プロファイルを比較し、老化 NSGCs で高発現を示す液性因子関連遺伝子の抽出を行った (fold change >10.0)。その結果、老化 NSGCs において、SASP の一種であり、血管新生に強く関わる血管内皮増殖因子 (VEGF) -C の発現が顕著に高いことがわかった。また、培養上清 (CM) 中の VEGF-C のレベルが、GSCs や分化 NSGCs に比べ、老化 NSGCs で顕著に高く、血管新生因子 VEGF-A や主要な SASP 因子であるインターロイキン (IL) -6 と IL-8 のレベルについても同様の結果が得られた。以上の結果から、老化 NSGCs は、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。

⑤ 老化 NSGCs による VEGF を介した血管新生の促進と GSC 由来腫瘍形成の向上

老化 NSGCs が、SASP を含む液性因子を分泌することで、GBM 中の血管新生を促進することが示唆されたことから、老化 NSGCs の CM 下での脳由来ヒト血管内皮細胞の増殖促進の可能性を検証した。結果、通常の培地で培養した血管内皮細胞の数に比べ、老化 NSGCs の CM 下の細胞数は、3-4 倍増加した。抗 VEGF 抗体を老化 NSGCs の CM に添加したところ、CM による HBMEC の増殖促進は抑制された。また、老化 NSGCs と GSCs を免疫不全マウスの皮下に同時移植した群では、GSCs の単独移植群に比べ、腫瘍組織内部の血管内皮細胞マーカー CD31 の発現が増加していることがわかった。さらに、老化 NSGCs と GSCs の同時移植群では、GSCs 単独移植群もしくは分化 NSGCs (老化前) と GSCs の同時移植群に比べ、腫瘍形成率の向上ならびに腫瘍の増大が確認された。以上の結果から、老化 NSGCs は、SASP を介した傍分泌により、血管新生を促進させ、GBM の悪性を促すことが示唆された。

<まとめと考察>

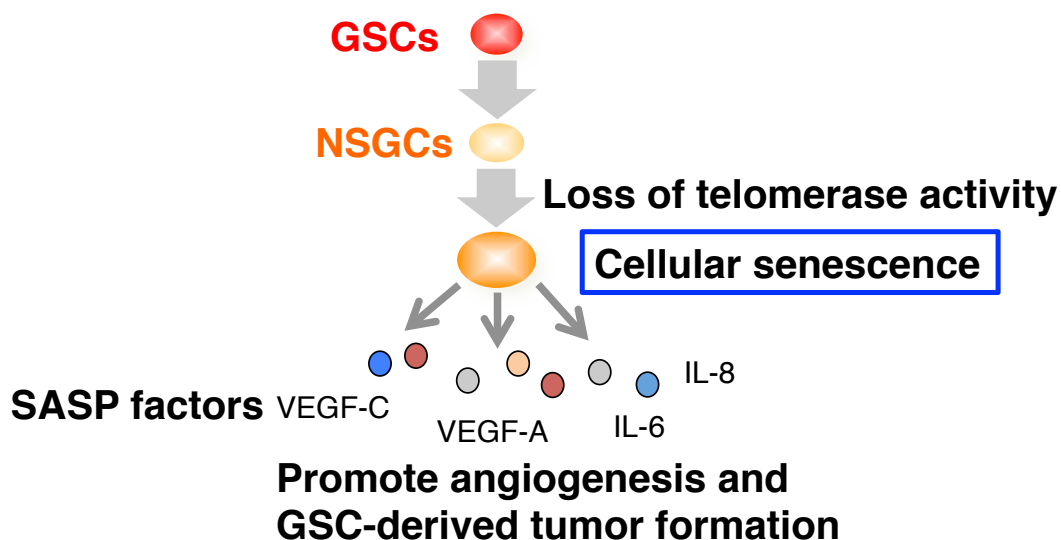
我々は、本研究により、以下の 3 点を明らかにした (図 1)。(1) NSGCs は、テロメラーゼ活性消失による末端複製問題に伴い細胞老化に至る。(2) 老化 NSGCs は、VEGF-C、VEGF-A、IL-6、IL-8 を含む血管新生に強く関わる液性因子を豊富に分泌する。(3) 老化 NSGCs は、血管新生を促進させ、GSC 由来の腫瘍形成を向上させる。

がん細胞は通常、無限・無秩序に増殖を続け、細胞塊を形成・拡大すると考えられている。しかし、本研究により、GBM の場合、がん細胞の中でも非がん幹細胞 (NSGCs)

が、自然に老化を引き起こすことがわかった。また、がん細胞において細胞増殖を抑制する重要な過程である細胞老化が、SASP を介した細胞非自立的制御により、がんの悪性を促進するという、がんの促進と抑制の2つの働きを担っていることがわかった。

現在、GSCs を標的とした GBM 治療法の開発が注目されており、その中には、人為的に GSCs を NSGCs に分化誘導させる治療開発の試みがなされている。一方、NSGCs は唯一の GBM 治療薬テモゾロミドに耐性を示すことが報告されている。さらに、本研究結果ならびに近年報告された NSGCs の GSCs への脱分化する性質を踏まえると、NSGCs は、GSCs と同様に GBM の悪性化に強く関わっていることが考えられる。今後、GBM 根治治療法は、GSCs だけに特化した治療法の開発では不十分であり、NSGCs も標的とした開発が必要であるといえる。

<図 1>



Our observations suggest that...

- 1. NSGCs exacerbate GBM malignancy.***
- 2. Cellular senescence works as a double-edged sword in a tumor microenvironment.***