

学位論文題名

A novel adherent culture method of glioblastoma stem-like cells using type 1 Collagen

(コラーゲン 1 を用いた膠芽腫幹細胞の接着培養法の新規開発に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】1997年に急性骨髄性白血病においてその腫瘍細胞起源を示す癌幹細胞の存在が示唆されて以降、固形癌においても癌幹細胞の報告が相次いでいる。髄芽腫や膠芽腫などの脳腫瘍においては CD133 発現群が癌幹細胞としての能力を持つことが報告されている。悪性脳腫瘍、特に膠芽腫は現在の標準治療である可及的外科摘出、放射線治療、アルキル化剤であるテモゾロマイドを用いた集学的治療を行った場合でも中央生存期間は2年に満たず、極めて予後不良の疾患である。癌幹細胞は腫瘍の発生、増大、浸潤、再発に深く関与するとされ、手術による完全摘出が困難な脳腫瘍分野における新たな治療標的である。

これまで癌幹細胞の培養に関しては、無血清培地にいくつかの増殖因子を加え球体 (sphere) を形成させることで幹細胞を濃縮させる方法が一般的であった。しかし sphere 形成法では幹細胞を未分化状態に維持できず、また内部が壊死することがあり、問題であった。これらの現象は幹細胞の未分化維持に働く各種因子や幹細胞機能を維持する各種栄養因子が sphere 内部に浸透できないために生じると考えられる。これは *in vitro* における抗腫瘍実験に際しても均等な薬剤への暴露が困難である点などから大きな障壁になり、接着培養系における癌幹細胞増殖法の確立が重要と考えられてきた。

近年になり、laminin coated plate を用いた接着培養での癌幹細胞増殖が可能なことが報告された。ただし、laminin は冷蔵保存が必要で管理が煩雑であり、本研究では室温保存が可能な type 1 collagen coated plate の膠芽腫幹細胞接着培養への応用の可否を検討した。

【対象と方法】膠芽腫幹細胞の代表的なマーカーである CD133 陽性細胞の局在を検討すべく、膠芽腫の標本を用いて連続切片を作成し type 1 collagen と CD133 の免疫染色を行った。また、一般的なヒト膠芽腫細胞株である U87MG と手術検体から作成した Primary culture を Non-coated plate (Non-coat)、type 1 collagen-coated plate (Col)、laminin-coated plate といった各種環境で、serum contained medium (SCM) もしくは各種増殖因子を添加した幹細胞用の serum free medium (SFM) を用いて培養した。各々の条件における RNA レベル・タンパクレベルでの幹細胞マーカーの発現の程度を RT-PCR と免疫細胞染色にて半定量的に解析した。また、Col/SFM で培

養された膠芽腫細胞の幹細胞性の有無を検討する目的で Sphere 形成能を limiting dilution assay で検討した。また、免疫不全マウスであるヌードマウス (5・8 週齢) へ、Col/SFM で培養した膠芽腫細胞を 1 万個から 10 万個 putamen に定位的に移植することでその腫瘍形成能を検討した。

【結果】 CD133 陽性細胞は壊死組織周囲と腫瘍血管周囲に存在する type 1 collagen に接するように局在することがわかった。SFM による培養では、U87MG は Non-coat にて Sphere 形成が確認され、Lam にて Hemisphere を形成し、均等な薬剤暴露を目的とした接着培養に不向きであることが判明した。一方で Col は SFM 培養においても単層培養の状態を維持し本研究の目的の必要条件を満たすことが分かった。Col/SFM で培養した U87MG と膠芽腫細胞において CD133 や Nestin の発現増強が認められた。また、Col/SFM で 10 回以上継代した膠芽腫細胞は Non-coat/SFM で培養することにより高率に Sphere 形成を認め、幹細胞性を維持していることが示唆された。免疫不全マウスへの移植で Col/SFM にて培養した膠芽腫細胞は 1 万個の移植でも腫瘍形成を認めた。

【考察】 新たな治療標的として注目されている癌幹細胞の特徴として抗癌剤や放射線治療への耐性が報告されており、再発に深く関与していることが示唆されている。また、免疫不全マウスへの移植で強い組織浸潤能を持つ事が報告されるなど、腫瘍の性格の再現性も優れている。このように癌幹細胞は in vivo, in vitro のいずれにおいても癌治療研究において重要な存在となっており、簡便かつ利便性の高い培養条件の確立が望まれる。Pollard らは laminin による adherent culture にて培養した細胞は高い確率で細胞株として樹立可能であり、強い腫瘍形成能を持ち、sphere 法よりも有効であることを報告している。今回の研究で type 1 collagen と EGF や FGF2 などを含む SFM との組み合わせが細胞増殖・CD133 の発現の両面から有用であることが示唆された。

再生医療の分野において、Lee らの報告では、collagen I coated plate/SCM で増殖させた骨髄間質細胞が中枢神経への移植で神経細胞マーカーやグリア系のマーカーを発現している。これらのことは、collagen I coated plate が多分化能を維持したまま骨髄間質細胞を培養でき、癌幹細胞という未分化な細胞培養への応用に適している可能性も示唆する。実際に Col/SFM で培養した膠芽腫細胞は腫瘍形成能を持ち、培養条件を変更すれば Sphere 形成能も持ち、幹細胞性を維持していると言える。また、Col/SFM での培養は簡便かつ安定した細胞増殖を示し、得られた手術検体が少ない場合や Sphere を形成しにくい腫瘍への応用が期待できる。Type 1 collagen が幹細胞性を維持する機序に関しては直腸癌細胞株を用いた研究で $\alpha 2 \beta$ integrin の関与が指摘されているが、膠芽腫においては検討できておらず、今後の課題と言える。

【結論】 type 1 collagen によって膠芽腫細胞は接着培養を維持したまま CD133 や Nestin といった幹細胞マーカーを強く発現するようになり、Sphere 形成能や腫瘍形成能も持ち、膠芽腫幹細胞接着培養法の新たな選択肢となりえることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 伸 哉
副 査 教 授 近 藤 亨
副 査 教 授 松 野 吉 宏
副 査 教 授 寶 金 清 博

学位論文題名

A novel adherent culture method of glioblastoma stem-like cells using type 1 Collagen

(コラーゲン1を用いた膠芽腫幹細胞の接着培養法の新規開発に関する研究)

発表内容はグリオブラストーマにおける癌幹細胞接着培養法の確立に関する研究である。

髄芽腫や膠芽腫などの脳腫瘍においては CD133 発現群が癌幹細胞としての能力を持つことが報告されている。悪性脳腫瘍、特に膠芽腫は現在の標準治療である可及的外科摘出、放射線治療、アルキル化剤であるテモゾロマイドを用いた集学的治療を行った場合でも中央生存期間は2年に満たず、極めて予後不良の疾患である。癌幹細胞は腫瘍の発生、増大、浸潤、再発に深く関与するとされ、手術による完全摘出が困難な脳腫瘍分野における新たな治療標的であると考えられる。

これまで癌幹細胞の培養に関しては、無血清培地にいくつかの増殖因子を加え球体 (sphere) を形成させることで幹細胞を濃縮させる方法が一般的であった。しかし sphere 形成法では幹細胞を未分化状態に維持できず、また内部が壊死することがあり、問題であった。これらの現象は幹細胞の未分化維持に働く各種因子や幹細胞機能を維持する各種栄養因子が sphere 内部に浸透できないために生じると考えられる。これは *in vitro* における抗腫瘍実験に際しても均等な薬剤への暴露が困難である点などから大きな障壁になり、接着培養系における癌幹細胞増殖法の確立が重要と考えられており、その培養法に関して検討している。

本研究では室温保存が可能な type 1 collagen coated plate の膠芽腫幹細胞接着培養への応用の可否を検討した。

U87MG、グリオブラストーマの primary culture を検討したが、CD133 陽性細胞は壊死組織周囲と腫瘍血管周囲に存在する type 1 collagen に接するように局在することがわかった。SFM による培養では、U87MG は Non-coat にて Sphere 形成が確認され、Lam にて Hemisphere を形成し、均等な薬剤暴露を目的とした接着培養に不向きであることが判明した。一方で Col は SFM 培養においても単層培養の状態を維持し本研究の目的の必要条件を満たすことが分かった。Col/SFM で培

養した U87MG と膠芽腫細胞において CD133 や Nestin の発現増強が認められた。また、Col/SFM で 10 回以上継代した膠芽腫細胞は Non-coat/SFM で培養することにより高率に Sphere 形成を認め、幹細胞性を維持していることが示唆された。免疫不全マウスへの移植で Col/SFM にて培養した膠芽腫細胞は 1 万個の移植でも腫瘍形成を認め、癌幹細胞培養にコラーゲン 1 が有用であるとの報告であった。

今回の研究発表に対して、副査の近藤先生からの質問があり、Sphere を実際にカットして CD133 の免疫染色を行って、その分布をみると接着培養、もしくは sphere のどちらが有用な培養法か判別できるのではないか、とのコメントがあった。また、CD133/nestin 以外に検討したマーカーはないか、との質問があった。

それに対しては、CD15 の検討を行い、コラーゲンで増強することは確認できているが、追試できていないため、今回は報告には含めていないとのコメントであった。

松野教授からは、コラーゲン 1 で培養した細胞の幹細胞性はどのように示されるのか、との質問があった。それに対しては、Sphere 形成させる condition に Col/SFM を戻すことによって Sphere 形成能を保っていることが確認された、との回答であった。

田中先生からは、今後はより少数の細胞移植で腫瘍形成能があるかないかを確認する事と、継代しての腫瘍形成があるかないか、を確認した方がよいのでは、とのコメントがあった。また、腫瘍の分子生物学的なプロファイリングと今回のコラーゲン 1 との関連、EMT チェンジなど今後調べていくと面白いのではないかと、とのコメントがあった。それに対して、IDH1 mutation はコラーゲン生成に係わっているとの報告があり、IDH1 mutation グループが予後が良い理由とコラーゲンという ECM の関連が興味深く、今後検討していきたい、との返答があった。

資金教授からは、sphere を構成している細胞とコラーゲンで培養した細胞には何か差があるのだろうか、との質問があった。

返答として、推察の域を出ないが、Sphere を構成している細胞は自身で ECM を分泌するなど、幹細胞維持の環境を形成する能力を持ったものがより濃縮されているが、コラーゲンでの培養細胞は、自身では幹細胞維持の環境を維持する能力が低い、つまり幹細胞性がより低いものも含まれているため、腫瘍形成スピードが遅いことが考えられるとの返答であった。

この論文の基礎論文は Neuro-oncology に投稿中であるが、癌幹細胞をターゲットとした drug screening の実験系を確立するうえで布石となるデータを提供しうると考えられ、審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと考えられた。