



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイドロゲルを用いた髄膜腫がん幹細胞マーカーの検索 [全文の要約]
Author(s)	小田, 義崇
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2685 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14941号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86044
Type	doctoral thesis
File Information	ODA_Yoshitaka_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

ハイドロゲルを用いた髄膜腫
がん幹細胞マーカーの検索

(Development of novel stem cell marker for meningioma
using hydrogels)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

小田 義崇

学 位 論 文 (要 約)

ハイドロゲルを用いた髄膜腫
がん幹細胞マーカーの検索

(Development of novel stem cell marker for meningioma
using hydrogels)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

小田 義崇

要約

【背景と目的】

髄膜腫は原発性脳腫瘍の40%程度を占める腫瘍であるが、大部分はWHO grade Iに分類され、切除により完全治癒を得られる症例が多い。そのため他の脳腫瘍に比して予後は比較的良好であるが、頻度では少ない膠芽腫に比して研究の進んでいない分野である。現時点では再発症例や手術不能症例が問題となり、放射線療法以外に有効な治療は開発されていない。遺伝子変異も予後不良、予後良好に関与する遺伝子変異は知られているが、治療標的となる分子は同定されておらず、腫瘍化のメカニズムも分かってはいない。

がんの転移・再発や治療抵抗性の原因は、がん幹細胞の存在によるがん幹細胞仮説という考え方がある。がん幹細胞はがん細胞でありながら、正常組織の幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を有する細胞と定義され、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが明らかとなっている。がんの根絶にはがん幹細胞に対して有効な治療が不可欠であるが、がん幹細胞はがん組織内にわずかにしか存在せず、がん幹細胞の効率的な採取方法が求められている。髄膜腫においてもがん幹細胞の役割や機能の解析は十分ではない。

がん幹細胞の収集方法としては、サイドポピュレーション法に代表されるフローサイトメトリーによるソーティングや培養基材による濃縮などの手法が試みられている。しかし、フローサイトメトリーでは細胞へのダメージが大きく、*in vivo*動物実験などに用いにくいことが問題となる。培養基材を用いた濃縮では、時間がかかることが問題となっている。またどちらの方法でも全体の細胞数に占めるがん幹細胞の割合は少ないため、解析に必要な量のがん幹細胞を確保するのに大量の基材が必要となり、研究の進展を妨げてきた。

我々は近年、ハイドロゲルという培養基材を用いた、がん幹細胞を誘導する新規の誘導方法を開発した。ハイドロゲルは親水性を有し、生体適合性が高く、生体内を模した培養環境を作れることが期待されている。

【方法】

1) 細胞株と培養方法：3種類の髄膜腫細胞株（HKB-MM、SF4068 SCC、SF4068 SCN）を3日間PS dish、DNゲル、PCDMEゲル、PNaSSゲル上で培養し、形態観察、RT-PCRによる遺伝子発現解析、およびWestern blottingによる蛋白質発現解析を行った。2) マイクロアレイ解析：PS dish、DNゲル、PCDMEゲル、PNaSSゲル上で培養したWY08細胞、WY09細胞を用いて遺伝子発現量の差を網羅的に解析し、髄膜腫癌幹細胞を標的とした治療候補分子としてケメリン受容体CXCR4（chemokine receptor type 4）を選定した。3) ゼノグラフト実験：PNaSS

ゲル上と PS dish 上で培養した 1 週間培養した WY08 細胞を SCID マウスの皮下に移植して異所性移植モデルを作製し、PNaSS ゲルによる腫瘍形成能への影響と腫瘍内での CXCR4 の発現極性を検討した。4) ヒト検体を用いた免疫組織化学染色：抗 CXCR4 抗体を使用し髄膜腫病理検体 54 例に対して免疫組織化学染色を行い、自ら設定した判定方法を用いて、組織型や遺伝子変異との相関を解析するとともに、脳浸潤症例における CXCR4 の発現極性を検討した。40 例は PFPE(PAXgene Tissue-fixed and paraffin-embedded)検体、14 例は FFPE(Formalin Tissue-fixed and paraffin-embedded)検体であった。5) CXCR4 阻害剤の暴露実験：PS dish および 3 種のハイドロゲル上で培養した 3 種の髄膜腫細胞 (HKB-MM、WY08、WY09) に 2 種の CXCR4 阻害剤(AMD3100、Fc131)を添加して形態の観察及び、がん幹細胞関連遺伝子の発現変動を解析した。また同時に CXCL12 の recombinant protein の添加を行い、がん幹細胞関連遺伝子の発現変動を解析した。6) 蛍光免疫染色: CXCR4 及びがん幹細胞関連遺伝子の発現局在を検討するため 3 種の髄膜腫細胞 (HKB-MM、WY08、WY09) を用いて蛍光免疫染色を行った。

【結果】

1) ハイドロゲルによる幹細胞性誘導の検証：3 種のハイドロゲル上で培養した 6 種類の髄膜腫細胞は、DN ゲルおよび PCDME ゲル上では全て細胞集塊 (スフィア) を形成し、PNaSS ゲル上では単層に接着した形態を示した。Real-time PCR では、すべてのゲル上で培養した細胞で *Nanog*、*Oct3/4* などの幹細胞マーカー遺伝子の発現亢進が認められた。2) マイクロアレイ解析: 2 種の髄膜腫細胞と 3 種のハイドロゲルの組み合わせの 6 条件すべてにおいて、PS dish と比較して 4 倍以上発現が亢進した遺伝子を抽出した。これらの遺伝子を対象に DAVID の pathway 解析と自作のプログラムを用いた網羅的文献検索を行い、CXCR4 を髄膜腫がん幹細胞マーカー候補分子として選択した。また Real-time PCR で CXCR4 及びそのリガンドである CXCL12 の発現量の増加を確認した。3) ゼノグラフト実験：PNaSS ゲル上で培養した髄膜腫細胞において、マウス生体内での腫瘍形成能が高かった。また PNaSS ゲル上で培養した細胞では多結節状の腫瘍形成 (satellite nodule)が見られ、静脈侵襲も観察された。また、腫瘍組織内で CXCR4 は腫瘍中心部とともに腫瘍と正常部の境界 (invasive front) に発現が認められた。4) 免疫組織化学染色：CXCR4 発現強度を 4 段階に分類した。CXCR4 の発現強度の評価基準は、血管内皮の染色を内因性コントロールとして用いた。びまん性に血管内皮より強い染色を示す標本を 3+、5 個以上の腫瘍細胞集塊に血管内皮より強い染色を示す標本を 2+、血管内皮より弱い染色性を示す標本や 4 個以下の腫瘍細胞集塊に血管内皮より強い染色を示す標本を 1+として評価した。線維性組織や血管内皮のみへの染色を示す標本は 0+ (陰性) と判断した。予後不良

の組織型、NF-2 の変異や欠失を認める症例で CXCR4 の発現量が高かった。また脳浸潤症例では浸潤部 (invasive front) では陽性像を認めたが、接着しているだけの部分では認めなかった。また追加で行った NF2 の deletion を導入した細胞株では元の細胞株に対して CXCR4 の発現量、Nanog の発現量ともに低下が見られた。5) CXCR4 阻害剤の暴露実験：CXCR4 阻害薬によるがん幹細胞関連遺伝子の発現抑制は明らかではなかったが、CXCL12 の recombinant protein の暴露によって 幹細胞関連遺伝子の発現は亢進しており、CXCR4 が治療標的になる可能性が示唆された。6) 蛍光免疫染色: CXCR4 は Nanog 陽性細胞で発現していた。

【考察】

ハイドロゲル上で培養した髄膜腫細胞は、遺伝子発現によりがん幹細胞の性質を獲得していることが示された。マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動の網羅的解析から、治療候補分子として細胞膜上に発現する G 蛋白質共役受容体である CXCR4 を選定した。CXCR4 は他のがん種で予後不良との関連が示唆されており、MAPK kinase を介し、細胞増殖や転移能亢進、腫瘍微小環境の調整に関与すると報告されている。ゼノグラフト実験では、ハイドロゲルによる腫瘍形成能の増進と、浸潤性性質の獲得が認められた。CXCR4 の発現極性から、腫瘍の浸潤性獲得に CXCR4 が関与している可能性が示唆された。ヒト髄膜腫病理検体を用いた CXCR4 の免疫組織化学染色では、予後不良の遺伝子変異である NF-2 の欠失や変異がある症例で CXCR4 の発現量が高く、WHO grade II に分類される症例や WHO Grade I でも再発率の高い fibrous meningioma で CXCR4 の発現量が高く、予後との相関が示唆された。また、脳浸潤部に一致した CXCR4 の陽性像が見られ、浸潤性の獲得に CXCR4 が関与していることを支持する所見であった。

阻害剤実験で明らかながん幹細胞関連遺伝子の発現抑制は証明できなかったが、recombinant protein を用いた刺激実験でがん幹細胞関連遺伝子の発現が上昇しており、潜在的な治療標的分子として考えられた。蛍光免疫染色で、CXCR4 は Nanog とともに核に共発現している像が観察され、細胞表面の受容体に対してアンタゴニストとして作用する Fc131、AMD3100 では阻害効果が得られない可能性が示唆された。核内に発現する CXCR4 の機能抑制を目指し、今後は siRNA を用いたノックダウン実験などを計画する必要がある。また CXCR4 の下流である MAP kinase に作用するシグナルは複数存在し、より下流のシグナルを標的とした阻害実験も検討する必要がある。

【結論】

本実験により、CXCR4は髄膜腫における surrogate marker となり得ることが示された。今後、CXCR4のノックダウン、機能阻害実験、治療実験をさらに検討することで、治療標的となり得る可能性が示唆される。