

論文要旨

Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells

悪性グリオーマにおける CD133 陽性細胞由来細胞株の
遊走能におけるソニックヘッジホッグシグナル
の関与についての研究

内田 裕之

【序論および目的】ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナルは個体の発生段階において重要なシグナルであるが、近年悪性腫瘍における SHH はその下流、転写因子である Gli1, Gli2 を活性化し、腫瘍発生、細胞増殖ならびに細胞遊走能に関与していることが分かってきている。一方、悪性グリオーマにおける CD133 陽性細胞は腫瘍幹細胞として腫瘍の発生や維持に重要な役割をする細胞集団であるのではないかと考えられている。そこで、今回、悪性グリオーマにおける CD133 陽性細胞を抽出し細胞株を樹立し SHH シグナルが遊走能に関与するかを同細胞株にて解析した。

【材料および方法】鹿児島大学病院脳神経外科にて摘出された悪性グリオーマ組織より CD133 陽性細胞を抗体-磁気細胞分離装置にて分離培養し二つの細胞株 (GBM1, GBM2) を樹立した。まず、両細胞株が SHH シグナルの伝達経路における分子を発現しているかを RT-PCR にて解析した。続いて、これらの細胞株が SHH 刺激によって下流分子の発現の変化と遊走能が上がるかどうかの実験を行った。次に SHH シグナルがこれらの細胞株の遊走能に関わっているかを証明するために siRNA による SMO, Gli1, Gli2 のノックダウンを行い、SHH 刺激下における遊走能を評価した。遊走能の評価は wound healing assay にて行った。

【結果】GBM1, GBM2 の両細胞株は SHH のレセプターである PTCH とその下流分子である smoothed(SMO), Gli1, Gli2 を発現していることが確認できた。GBM1 細胞において SHH の下流分子である SMO, Gli1, Gli2 の mRNA 発現の上昇を認めるとともに SHH 刺激に

て遊走能の上昇を認めた。そこで、GBM1,GBM2 細胞において siRNA による SMO, Gli1, Gli2 のノックダウンをそれぞれ行った結果、両細胞ともすべての下流分子の発現低下とともに SHH にて誘導される遊走能が抑制されるという結果を得た。

【結論及び考察】 本研究から SHH シグナルは悪性グリオーマにおける CD133 陽性細胞の遊走能において重要なシグナルの一つであるということが推測された。

(Journal of Neuro-Oncology 2011 ; 104 (3) : 697-704 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医研第	693号	氏名	内田 裕之
審査委員	主査	古川 龍彦		
	副査	中川 昌之	岸田 昭世	

Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells

(悪性神経膠腫由来 CD133 陽性細胞より樹立した細胞株の運動に対する Sonic hedgehog signaling pathway の役割)

細胞表面抗原 CD133 は腫瘍幹細胞マーカーの一つと考えられており、近年 glioma においては、CD133 陽性細胞が tumor initiating cell としての地位を確立しつつある。Sonic hedgehog (SHH) signaling pathway では、SHH 蛋白質が受容体である PATCHED に結合すると 7 回膜貫通型受容体である SMOOTHENED の抑制が解除され、その下流の GLI が活性型となって核内へ移行し転写活性を発揮する。SHH signaling pathway は胎生期の発生や分化に不可欠な経路であるが、その異常な活性化が種々の悪性腫瘍において確認されており、それら悪性腫瘍の発生に関与すると考えられている。

最近では endothelial progenitor cell や種々の悪性腫瘍において、SHH signal により遊走能が活性化されることが報告されている。glioma においては SHH signal が増殖や glioma stem cell の自己複製能に関与するとの報告はあるが、遊走能に関しての知見は未だ明らかではない。今回、学位申請者らは悪性神経膠腫由来 CD133 陽性細胞より接着腫瘍細胞株を樹立し、SHH signaling pathway が遊走能に与える影響について検討した。

神経膠芽腫症例より切除された腫瘍標本から、自動磁気細胞分離装置を用いて CD133 陽性細胞を分離し、無血清培地にて tumor sphere の形成をおこなった。その後、培養していく過程で接着細胞の形態に変化して増殖し、無血清培地で継代培養可能な 2 株の細胞株を樹立した。これら細胞株を用いて、SHH 経路に関与する分子の遺伝子発現の解析や遊走能との関わりの評価を行い、以下の知見が得られた。

1) 樹立された細胞株は、無血清培地下に noncoated dish に接着して増殖する性質をもち、それら細胞群中の CD133 細胞の陽性率は 8 - 23%であった。2) 2 つの細胞株ともに、SHH pathway に関与する PATCHED や SMOOTHENED、GLI1、GLI2 の発現が認められた。3) SHH 蛋白質を投与した群において、SMOOTHENED や GLI1、GLI2 の遺伝子発現の上昇がみられ、かつ遊走能の亢進が観察された。4) SMOOTHENED や GLI1、GLI2 に特異的な siRNA の導入による SHH 経路の阻害により遊走能の低下がみられた。

以上のように、本研究では、一般的な glioma 細胞株よりも CD133 陽性細胞の豊富な glioma 細胞株において、SHH signaling pathway が遊走能へ関与することを示した点で意義が深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 693 号	氏名	内田 裕之
審査委員	主査	古川 龍彦	
	副査	中川 昌之	岸田 昭世

主査および副査の3名は、平成24年2月16日、学位請求者 内田裕之君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) glioma では CD133 を発現していれば腫瘍幹細胞と言えるのか。

(回答) glioma では CD133 陽性細胞が腫瘍幹細胞の有力なマーカーの一つと考えられている。さらに本研究では CD133 陽性細胞のうち無血清培地で sphere を形成した細胞集団のみを用いている。他にも nestin や musashi など幹細胞に発現している分子として同定されている。

質問 2) 今回は遊走だけをみているが、浸潤能や転移能についてはどうか。

(回答) 他の癌腫では転移能にも関与しているとの報告もあるが、glioma においては今後の研究課題である。

質問 3) CD133 陽性細胞と陰性細胞で遊走能の比較はしていないのか。

(回答) 行っていないが、陰性細胞の遊走が今回の実験結果にある程度の影響を及ぼしていることが考えられ、今後の課題である。

質問 4) 元来 CD133 陽性細胞のみを継代培養したはずなのに、最終的に CD133 陽性細胞の割合が低くなっているが、継代の過程で下がっていくのか。

(回答) 接着細胞への分化や継代の過程でも下がっていくと考えられるが、sphere のままで接着細胞へ分化しなくても増殖の過程で陽性率は下がっていくという報告がある。Sphere での CD133 陽性率は 27%であった。

質問 5) sphere と接着細胞では性質の違いがあるか。

(回答) 遊走能に関しては比較していないが、SHH (sonic hedgehog) 経路の分子群の遺伝子発現の程度は同様であった。

質問 6) SHH 経路は他のどのような経路を介して情報伝達しているのか。

(回答) AKT/PI-3 kinase 経路を介して情報伝達しているとの報告がある。

質問 7) wound healing では細胞運動だけではなく増殖しているのではないか。

(回答) 増殖に関しては客観的な評価はおこなっていないが、24時間後の比較では、視覚的に細胞密度に大きな違いは認められなかった。

質問 8) sphere を形成すると wound healing assay はできないと思うがどうか。

(回答) その通りである。実際、浮遊細胞で chemotaxis assay を試みたが、chemotaxis chamber の membrane に接着しないと問題があったため、sphere から接着細胞に変化した細胞株を用いて assay をおこなった。

最終試験の結果の要旨

質問 9) CD133 にこだわらずに、glioma では SHH は遊走に関与しているのか。

(回答) 関与していると考えられるが、今回は陽性細胞と陰性細胞を対等な条件下では比較できなかった。

質問 10) GLI の標的遺伝子は何か。

(回答) 増殖に関しては cyclin D1、N-myc がわかっている。遊走に関しては、Snail や MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) が報告されている。

質問 11) 細胞株ができた症例と、できなかった症例の違いは何か。

(回答) 腫瘍組織は一樣ではなく、症例により細胞密度や CD133 陽性細胞数が異なることが挙げられる。また、組織中に血管や線維組織が多いと、dissociation の過程で、より大きな侵襲が細胞に加わってしまうという手技上の問題もある。

質問 12) CD133 陽性細胞数は、集めてきた腫瘍細胞の数に比例するのか。

(回答) 必ずしも比例するとはいえないが、今回の 6 例では概ね 0.7-0.8% 程度であった。

質問 13) sphere を培養した条件はどのようにして決定したか。

(回答) 過去の報告を参考に、神経系細胞の培養に適した培養液と栄養のもとに、tumor sphere の形成を目的に、分化を抑制し増殖を促すような growth factor の組み合わせを選択した。

質問 14) SHH 経路の分子群の発現は正常な状態よりも高いのか。

(回答) 正常細胞との比較は行っていないが、CD133 陽性細胞と陰性細胞との比較では、遺伝子発現には一貫した傾向というのはいみられなかった。

質問 15) glioma で PTCH (PATCHED) の変異は報告されているか。

(回答) glioma での報告はないが、medulloblastoma においては報告されている。

質問 16) cyclopamine などの薬剤での反応性はみていないのか。

(回答) cyclopamine を用いた実験も行い、用量依存性に遊走が抑制されたが、使用した濃度では細胞傷害性も高くなると考えられたので、その結果を論文には入れていない。

質問 17) SHH 経路は細胞死や増殖に関係していると考えられるがどうか。

(回答) 関係していると推測されるので、今後検討したい。

質問 18) 培養細胞中では SHH は発現していたのか。

(回答) 蛋白質レベルでは調べていないが、遺伝子レベルでは 2 株とも発現していた。

質問 19) 臨床サンプルでは HH (hedgehog) 変異のメカニズムはあるのか。

(回答) glioma では解明されていない。

質問 20) figure 3 では wound は閉じていないように見える。

(回答) 24 時間の観察ではどちらもまだ wound は閉じていないが、遊走した距離では差がみられた。

以上の結果から、3名の審査委員は学位申請者が大学院博士課程修了者としての学力と識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。