

原 著

## 放射線照射神経膠芽腫における 腫瘍幹細胞の動態と遺伝子解析

昭和大学医学部脳神経外科学教室

中條 敬人 佐々木晶子

泉山 仁 阿部 琢巳

昭和大学歯学部口腔病理学教室

山本 剛 立川 哲彦

要約：神経膠芽腫（Glioblastoma: GBM）は手術加療のみでは根治が困難な腫瘍で、現在は手術や放射線療法、化学療法を組み合わせる治療が行われている。しかしながら、本腫瘍は放射線・化学療法に対して抵抗性があり、再発が見られ、根治には至らないのが現状である。このような腫瘍の再発や放射線、薬物抵抗性には腫瘍幹細胞の関与が強く疑われる。われわれは腫瘍幹細胞の存在とその性状解析のために、ヒト由来 GBM 細胞株 T98G, A172 細胞を用い臨床治療と同条件の放射線照射 GBM 細胞を作製した。放射線照射後細胞（0 Gy, 30 Gy, 60 Gy）を用いて細胞増殖率の解析や side population (SP) の解析, CD133<sup>+</sup>細胞の分離, 遺伝子解析を行った。本研究結果では CD133<sup>-</sup>細胞と比較して CD133<sup>+</sup>細胞で幹細胞関連遺伝子が高く発現していた。従って、それは腫瘍幹細胞がこれらの CD133<sup>+</sup>細胞に含まれる可能性があることを示唆した。T98G 細胞において、30 Gy 照射後細胞は無照射細胞、60 Gy 照射後細胞に比べ細胞増殖率が高い傾向にあり、30 Gy 照射後 CD133<sup>+</sup>細胞は幹細胞関連遺伝子がより高く発現していた。つまり T98G は、抗腫瘍効果の観点で、30 Gy 前後の放射線照射で化学療法がより効果を示す可能性が示唆された。この遺伝子解析から腫瘍増殖は CD133<sup>+</sup>細胞が強く関与していることが示唆され、また放射線照射により CD133<sup>+</sup>細胞に何らかの変化が生じ、治療抵抗性や治療効果に影響を及ぼしていると考えられた。

キーワード：腫瘍幹細胞, 神経膠芽腫, 遺伝子解析

神経膠芽腫 (glioblastoma: GBM) は最も悪性度の高い脳腫瘍で、手術加療のみでは完治が困難であり、術後放射線療法、化学療法が併用されることが多い。しかしながら、それらの療法に対して抵抗性を有し、いまだ平均生存期間が約1年、5年生存率は8%前後でありこの30年来改善していない<sup>1-9)</sup>。他の実質臓器の癌では正常組織を含め取り除くことで根治が期待できるが、脳はその臓器特殊性のため正常組織の切除は機能障害の危険性があるため腫瘍組織の残存はやむを得ない。以上のことは、脳腫瘍の集学的な治療の研究・発展にも関わらず、現在まで GBM に対する有効な治療法は確立されていないと言える。これらの事実から本腫瘍は、腫瘍幹細胞 (cancer stem cell: CSC) の存在が関与していると強く示唆され、さらに腫瘍の発生、浸潤、転移過程への関与が疑われる。

神経幹細胞は特定の培養条件下において均一な自己複製能、増殖能をもち、ある程度の期間維持していくことができる。さらに培養条件を変化させることで分化する多分化能を有している。生体内では血管や神経の走行に沿って遊走していく能力を持ち合わせている<sup>10)</sup>。このように神経幹細胞の①自己複製能、②多分化能、③血管・神経線維との親和性をもった遊走能が悪性腫瘍とよく一致することで、この応用から CSC の研究が始まった。幹細胞は2つに分類され、1つは胚性幹細胞であり、発生初期の胚に存在し個体を構成するすべての細胞に分化することが可能である。他の1つは体性幹細胞で器官形成後の各々の組織に存在し、自己増殖を行いそれぞれの組織の複製、維持を行っている。特に後者は組織の再生過程で中心的な役割を果たし、その多様性は①自己複製能、②多分化能、③組織再生能であ

る。また幹細胞は定常状態では細胞周期が静止期 G0 であること、様々な生理的あるいはストレスに対して抵抗性を有しているという特徴が挙げられる。さらに、癌組織内に少数の幹細胞が存在し階層構造により成り立っているという考え方があり、癌細胞の中には増殖能力の高い細胞と低い細胞が混在し、上位にある細胞が下位にある細胞の源となっている。

1970年に Dick らはヒト急性骨髄性白血病細胞で CD34 陽性、CD38 陰性細胞を見出し SCID-leukemia initiating cell として報告した<sup>11)</sup>。その後も CSC の存在が注目され、急性骨髄性白血病<sup>12)</sup> や乳癌で<sup>13)</sup> 同定され、それに続いて脳腫瘍からの同定も報告された<sup>14-17)</sup>。また、ヒト神経幹細胞は CD133 で精製できることが判明し、脳腫瘍組織は CD133<sup>+</sup>細胞を頂点とする階層性を有する不均一な集団からなることが報告された。GBM を含む様々な癌組織および癌細胞株に組織幹細胞に特異的な細胞表面抗原 CD133<sup>+</sup>細胞や side population (SP 細胞) が存在し、腫瘍形成に重要な働きをしていることが明らかとなった<sup>15, 18, 19)</sup>。

加えて、様々な治療の中で注目すべき点は放射線治療と CSC との関係であろう。放射線は生体組織に様々な生物学的反応を引き起こし、その主な作用は放射線により惹起される細胞死であり、細胞生存率の低下をきたす。このような放射線の生物学的作用を利用して、悪性脳腫瘍細胞の増殖抑制や細胞を死滅させている。しかし、腫瘍細胞は単一の生物学的性格を有しているのではなく様々な生物学的特徴の集団であり、放射線による生物学的効果は様々な表現を呈してくる<sup>20, 21)</sup>。近年、DNA の損傷に対し DNA の複製や積極的な細胞死を誘導するための遺伝子解析が行われているが、これらの研究では放射線照射量が臨床の癌治療に比べ少ない。われわれは 2006 年に GBM 細胞を用いて、実際に臨床で行われている放射線 (total 60 Gy) を照射した放射線耐性培養細胞を作製し報告した<sup>22, 23)</sup>。そこで、放射線照射より放射線耐性細胞株の耐性獲得過程で、いかなる遺伝子発現変化が起こり、その発現がいかなる細胞へと変化した結果であるかを検討した。

## 研究方法

頻回放射線照射後生存細胞を獲得し、それぞれの

細胞の SP 細胞の解析、また CD133 をマーカーとして細胞の分離を行った。Real-Time PCR で分離後細胞の遺伝子を解析し、放射線照射量による影響を評価した。

### 1. 頻回放射線照射後生存細胞の獲得<sup>22, 23)</sup>

#### 1) 細胞株と培養条件

Japanese Cancer Resources Bank のヒト由来 GBM 細胞株 A172, T98G 細胞を材料とした。培養液は DMEM, F12HAM (Sigma, Deisenhofen, Germany) に 10% 非働化ウシ胎児血清と 100 units/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin を加え 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。A172 細胞は週に 1 度培地を交換し 7~10 日毎に継代し、T98G 細胞は週に 2 度培地交換し、5~7 日毎に継代した。

#### 2) 照射機器と照射条件

線質は 4MV・X 線、線量率は 2 Gy/min、照射野は 25 cm × 25 cm、照射深度は 4.0 cm、室温で施行した。使用機器は MEVATRON KD2/50 (TOSHIBA, JAPAN) を使用した。

(1) 径 10 cm シャーレに  $2 \times 10^5$  個を照射 7 時間前に継代し X 線照射を施行した。照射条件は 2 Gy/1 回/day で、週 5 日照射した。

(2) 照射初日から 42 日間培養した細胞を -80°C で冷凍保存し、0~60 Gy 照射後細胞が揃ったところで解凍し 7 日間培養した。(60 Gy 照射後、生存細胞を確認)

以下、未照射細胞を R0G, 30 Gy 照射後細胞を R30G, 60 Gy 照射後細胞を R60G とした。

#### 2. 細胞増殖率

A172, T98G 培養細胞において R0G, R30G, R60G 照射後細胞を使用し 6 well cell culture シャーレに初期細胞を  $1 \times 10^4$  個とした。培養は 1. と同様に施行した。培地交換は 3 日おきに行った。Day8 までそれぞれの細胞数をセルソーター (BECK MAN COULTER®, Z1 coulter®) を用いてカウントした。

#### 3. 培養細胞からの Hoechst 33342 による SP 細胞解析

近年、多くの幹細胞が Hoechst33342 という DNA 蛍光色素に対して高い排出能を持つことが報告されており、Side Population (SP) 細胞と呼ばれている。Hoechst33342 は ABC トランスポーター (ABCG2) の発現により細胞から排出されるが、verpamil 処理を行うことで ABCG2 がブロックされ Hochst

33342の排出が阻害される。

#### 1) 培養条件

各々の細胞株の培養液は1.と同様である。T98G細胞は週に2度培地交換し7日間、A172細胞は週に1度培地を交換し10日間培養した。

#### 2) フローサイトメトリー

フローサイトメトリーはFACS Vantage (日本ベクトン・ディキソン社製)を用いた。A172, T98G培養細胞においてR0G, R30G, R60G細胞を使用した。各々の細胞培養シャーレからトリプシンとEDTAを用いて細胞を剥離し, 10 mM Hepes buffer, 1% Penicillin/Streptomycinを含んだHBSS (+)で回収した。遠心分離後, HBSS (+)で再混濁し, Hoechst33342 (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )でラベル化した。その細胞は150  $\mu\text{M}$  Verapamil添加群と無添加群とに分け, それぞれ37°C, 30分間培養した。培養後, 4°C, 300G, 5分間遠心し上清を除去した。死細胞除去のためpropidium iodide (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )で染色しHBSS (+)に浮遊させ, 測定まで氷上で静置した。その後, 細胞は $1 \times 10^6$ 個/mlになるように調整し, フローサイトメトリーにてSP細胞とnon-SP細胞の同定を行った。

#### 4. CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>細胞の分離

CD133は造血幹細胞, 前駆細胞のマーカーであり神経系腫瘍, 前立腺癌, 大腸癌の癌幹細胞マーカーの1つである。またGBMの癌幹細胞がCD133を用いて分離されている。

A172, T98G細胞株のR0G, R30G, R60G細胞でCD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>細胞の分離をmagnetic cell sorting (MACS<sup>®</sup>)を用いて行った。細胞は10 mM FBS buffer, 1% Penicillin/Streptomycinを含んだDMEM (SIGMA)により15 cmシャーレで培養後, トリプシンとEDTAを用いて細胞を剥離し0.5%FBSを含んだPBS(-)にて再混濁した。その後, 細胞数をセルソーター (BECK MAN COULTER<sup>®</sup>, Z1 coulter<sup>®</sup>)を用いてカウントした。遠心 (300×gで10分間)分離し上清を完全除去後に350  $\mu\text{L}/10^8$ 個の0.5%含有PBS buffer(-) (以下buffer)に再混濁した。この溶液に100  $\mu\text{L}/10^8$ 個のFcR Blocking 試薬混入後, 50  $\mu\text{L}/10^8$ 個のCD133/1(AC133)-Biotin標識した。4°Cで10分間静置した後, bufferで洗浄・遠心を2回繰り返し400  $\mu\text{L}$ のbufferに混濁した。その混濁液に100  $\mu\text{L}/10^8$ 個のAnti-Biotin

MicroBeadsを添加し, 4°Cで15分間静置・反応後, bufferを加え遠心, 沈殿した細胞塊をbuffer 500  $\mu\text{L}/10^8$ 個に溶解した。この溶液をmagnetにセットしたカラムに通し, さらに500  $\mu\text{L}$ のbufferで3回洗浄しCD133にラベル化されていない細胞 (CD133<sup>-</sup>)を抽出した。次にmagnetから外し1 mlのbufferをカラムに入れ, CD133にラベル化された細胞 (CD133<sup>+</sup>)を分離した。その後, 分離されたCD133<sup>-</sup>とCD133<sup>+</sup>をカウントした。

#### 5. CD133<sup>+</sup>細胞の免疫染色

それぞれの分離細胞においてCD133とCD44, Nestinの免疫染色を行った。

#### 6. CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>細胞の遺伝子解析

##### 1) RNAの抽出

RNA抽出キット (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, QIAGEN)を用いてRNAを回収した。

##### 2) RNAの定量

Nano Drop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (L.M.S. Tokyo, Japan)を用いて定量した。

##### 3) Realtime PCR

RT<sup>2</sup>Profiler PCR Array System (Bioscience Corporation), PAHS405 (human stem cell)を用いた。回収したtotal RNAはSuperArrayキットに付属されているGE (5 × gDNA Elimination Buffer)と, BC3 (5 × RT Buffer 3), P2 (Primer and External Control Mix), RE3 (RT Enzyme Mix3)を用いて逆転写, cDNAの合成を行った。合成されたcDNAに2 × SuperArray RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix, Diluted first strand cDNA synthesis reactionを添加しABI Standard Blocks:Bio-rad iCycler, MyiQ, and (MJ Research) Chromo 4 and Stratagene Mx3005p, Mx300pを用いて解析した。Real-time PCR条件はABI PRISM<sup>®</sup>7000 Sequence Systemを用いた。統計学的解析はunpaired Student's t-testを用いてp < 0.05を有意差ありと判定した (Fig. 1, 2)。

## 結 果

### 1. 細胞増殖曲線

#### 1) A172細胞について

細胞増殖は対照群であるR0Gは培養2日で, いずれの照射群と比較しても細胞増殖率に有意な差を認めなかったが, 培養4日目より照射群の細胞増殖

cell cycle regulators	chromosome and chromatin modulators	cytokines and growth factors	cell adhesion molecules
APC	GCN5L2	BMP1	APC
AXIN1	HDAC2	BMP2	BGLAP
CCNA2	MYST1	BMP3	CD4
CCND1	MYST2	CXCL12	CD44
CCND2	RB1	FGF1	CDH1
CCNE1	TERT	FGF2	GDH2
CDC2	gene regulating symmetric/ asymmetric cell division	FGF3	COL9A1
CDC42		FGF4	CTNNA1
EP300	DHH	GDF2	CXCL12
FGF1	NOTCH1	GDF3	NCAM1
FGF2	NOTCH2	IGF1	
FGF3	NUMB	JAG1	
FGF4	PAR6A	genes regulating cell- cell communication	metabolic markers
MYC	self-renewal markers		
NOTCH2	HSPA9	DHH	ABCG2
PAR6A	MYST1	DLL1	ALDH1A1
RB1	MYST2	GJA1	ALDH2
	NEUROG2	GJB1	FGFR1
	SOX1	GJB2	

Fig. 1 Stem cell specific markers

embryonic cell lineage markers	mesenchymal cell lineage markers	Notch Pathway	Wnt Pathway
ACTC1	ACAN	DLL1	ADAR
ASCL2	ALPI	DLL3	APC
FOXA2	BGLAP	DTX1	AXIN1
PDX1	COL1A1	DTX2	BTRC
ISL1	COL2A1	DVL1	CCND1
KRT15	PPARG	EP300	FRAT1
MSX1		GCN5L2	FZD1
MYOD1		HDAC2	MYC
T		JAG1	PPARD
hematopoietic cell lineage markers	neural cell lineage markers	NOTCH1	WNT1
		NOTCH2	
		NUMB	
		CD3D	CD44
		CD4	NCAM1
		CD8A	OPRS1
CD8B	S100B		
MME	TUBB3		

Fig. 2 Stem cell differentiation markers and Signaling pathways important for stem cell maintenance

が対照群より高い増殖率を示した。培養6日および8日でも照射群は対照群と比較して有意に高い細胞増殖率を示した。

一方、照射量で比較した場合、R30GがR60Gより培養8日で有意な高い細胞増殖率を示した (Fig. 3)。

### 2) T98G細胞について

T98G細胞の細胞増殖率はA172細胞とほぼ同様な細胞増殖率を示した。つまり、照射群は対象群と比較して有意に高い細胞増殖率を示したことから、R30GはR60Gより細胞増殖率が高い値を示した (Fig. 4)。

### 2. フローサイトメトリーによるSP細胞解析

1) A172細胞において Verapamil 添加群により R0Gでは0.035%, R30Gでは0.06%, R60Gでは0.087%のSP分画細胞が認められた (Fig. 5)。

2) T98G細胞において Verapamil 添加群により R0Gでは25.3%, R30Gでは26.8%, R60Gでは24.3%のSP分画細胞が認められた (Fig. 6)。

### 3. CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>細胞分離

1) A172細胞のCD133<sup>+</sup>含有率はR0Gで1.58-2.15%, R30Gで0.93-2.07%, R60Gで0.90-2.15%であった。

2) T98G細胞のCD133<sup>+</sup>含有率はR0Gで約1.0%、



### A172 growth curves after radiation

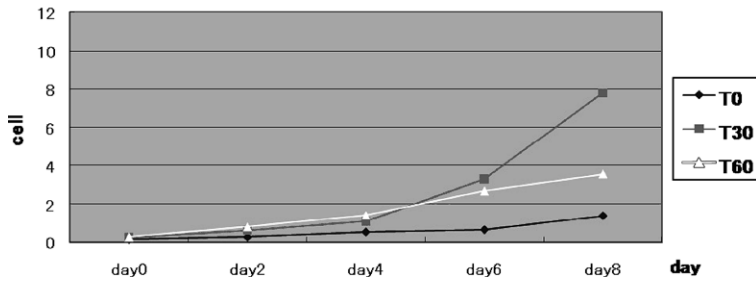


Fig. 3 Growth curves of A172 cells after radiation  
The cell proliferation rate was the highest for 30 Gy-irradiated cells.

### T98G growth curves after radiation

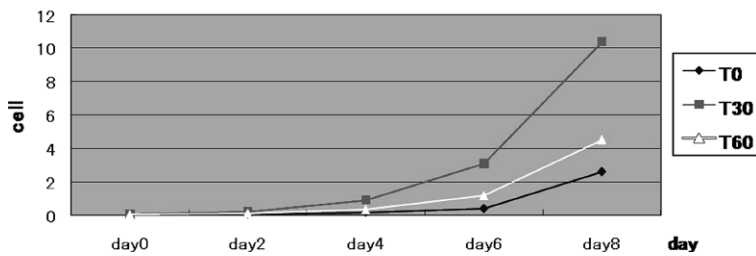


Fig. 4 Growth curves of T98G cells after radiation  
The cell proliferation rate was the highest for 30 Gy-irradiated cells.

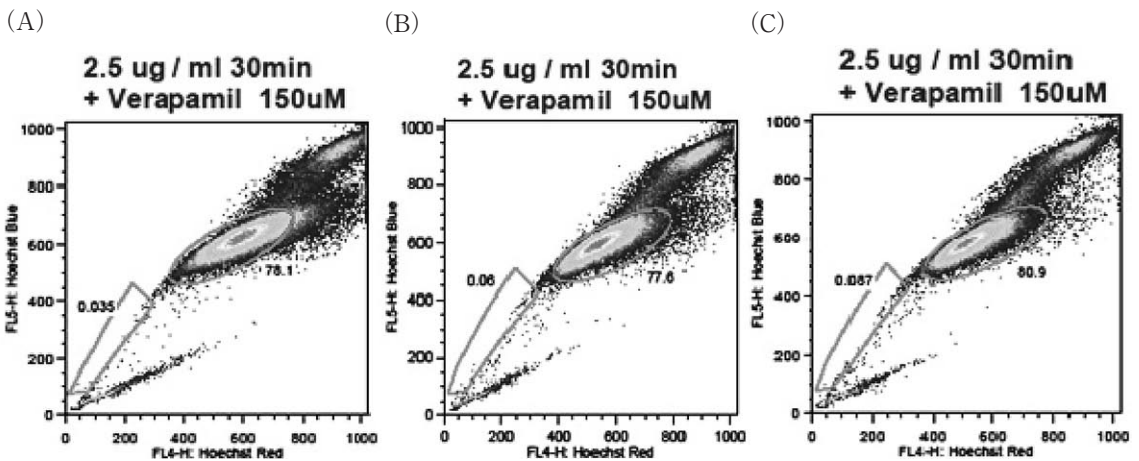


Fig. 5 Side population analysis of A172 cells.

- (A) The unirradiated A172 cells contained 0.035% SP cells.
- (B) The 30 Gy-irradiated A172 cells contained 0.06% SP cells.
- (C) The 60 Gy-irradiated A172 cells contained 0.087% SP cells.

R30Gで0.8-1.4%, R60Gで0.7-1.6%であった。

#### 4. CD133<sup>+</sup>細胞の免疫染色

CD133<sup>+</sup>細胞はCD133とCD44, Nestinで陽性を

示した (Fig. 7). しかし, 細胞の分化開始後では免疫染色が陰性の傾向にあった。

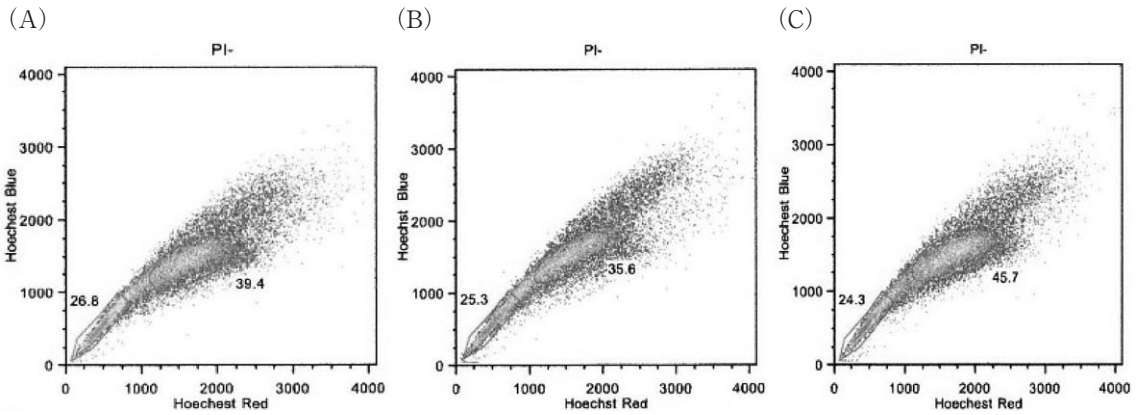


Fig. 6 Side population analysis of T98G cells

- (A) The unirradiated T98GA172 cells contained 26.8% SP cells.
- (B) The 30Gy-irradiated T98G cells contained 25.3% SP cells.
- (C) The 60 Gy-irradiated T98G cells contained 24.3% SP cells.

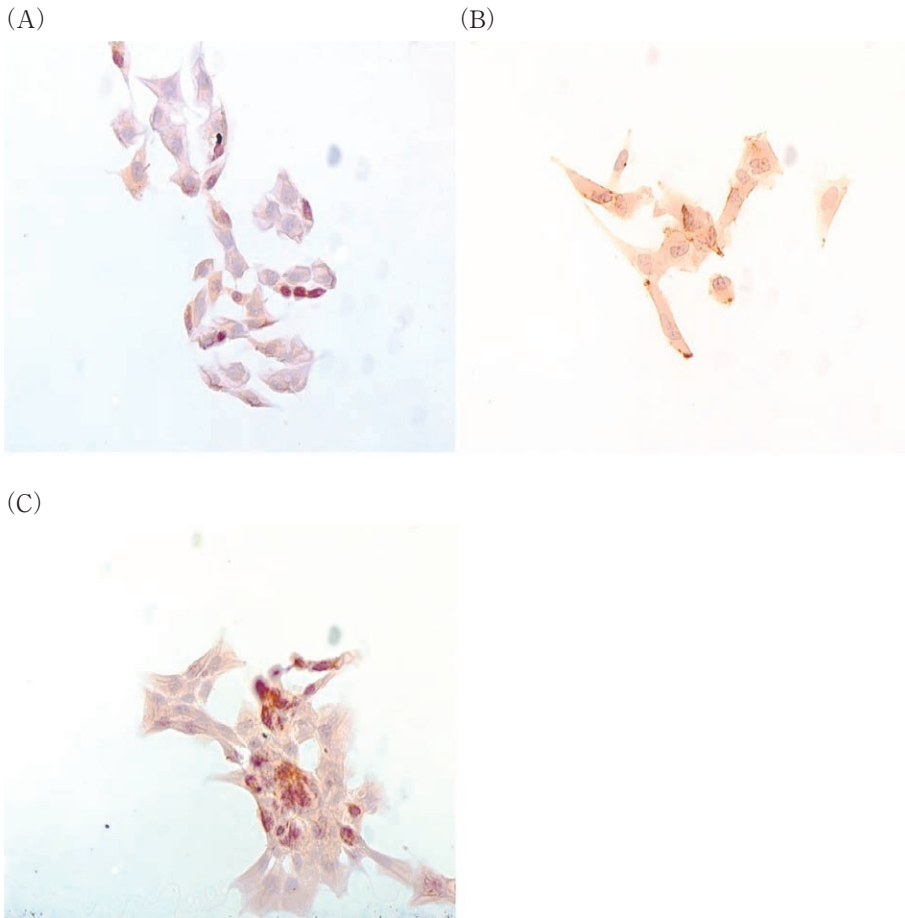


Fig. 7

- (A) CD133 positive cells showed positivity for CD133.
- (B) CD133 positive cells showed positivity for Nestin.
- (C) CD133 positive cells showed positivity for CD44.

5. CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>細胞の遺伝子解析結果

1) A172 細胞における CD133<sup>+</sup>と CD133<sup>-</sup>の比較  
各放射線照射量 (R0G, R30G, R60G) 照射後 A172 細胞の CD133<sup>+</sup>では CD133<sup>-</sup>と比較し多くの遺伝子増強が認められた。特に発現が明らかであった遺伝子は self-renewal markers (NEUROG2, SOX1), cell cycle regulators (CCND2, FGF3, FGF4), genes regulating cell-cell communication (GJB1), embryonic cell lineage markers (ASCL2, ISL1, MYOD1, PDX1), hematopoietic cell lineage markers (CD3D, CD4, CD8A, CD8B), cell adhesion molecules (CD4, CDH1, COL9A1), cytokines and growth factors (BMP3, FGF3, FGF4, GDF2, GDF3, IGF1), Notch pathway (DLL3), WNT pathway (WNT1) などであった。

2) T98G 細胞における分離前細胞と CD133<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>の比較

各放射線照射量 (R0G, R30G, R60G) 照射後 T98G 細胞の CD133<sup>+</sup>では分離前細胞と CD133<sup>-</sup>と比較し多くの遺伝子増強が認められた。特に発現が明らかであった遺伝子は self-renewal markers (SOX1, SOX2), genes regulating cell-cell communication (DHH, GJB2), embryonic cell lineage markers (ASCL2, ISL1), hematopoietic cell lineage markers (CD3D, CD8A, CD8B), notch pathway (DLL3, DVL1, EP300) などであった。

3) 放射線照射量による A172- CD133<sup>+</sup>の比較

R0G と R30G の比較では部分的に遺伝子発現増強が認められるのみであった。R0G と R60G の比較では大部分の遺伝子で発現増強が認められた。R30G と R60G の比較では大部分の遺伝子で発現増強が認められた。

4) 放射線照射量による T98G- CD133<sup>+</sup>の比較

R0G と R30G の比較では Notch pathway 関連遺伝子を認めた大部分の遺伝子で発現増強が認められた。BGLAP, BMP1, NOTCH1 の 3 つで有意差が確認された (Fig. 8)。R0G と R60G の比較では一部で遺伝子発現増強が認められた。R30G と R60G の比較では多くの遺伝子で発現抑制が認められた。ADAR, AXIN1, BMP1, CCND1, GCN5L2, JAG1, MME の 7 つで有意差が確認された (Fig. 9)。

## 考 察

脳腫瘍の中で最も悪性度の高い GBM は術後放射線療法、化学療法にも強い抵抗性を示すことが本腫瘍の特徴とも言える。この抵抗性の原因は腫瘍幹細胞との相関が示唆されている。なぜなら、腫瘍幹細胞は薬物排出能である ABC (ATP binding cassette) トランスポーターを有すると共に自己複製能、増殖能をもつことで放射線あるいは薬物抵抗性として表れる形質であると考えられている。本研究では GBM における CSC の存在とその細胞の遺伝子的性状について検討を行った。

GBM の細胞増殖率を放射線照射後の細胞について検索した結果、細胞増殖は対照群である R0G は培養 2 日で、いずれの照射群と比較しても細胞増殖率に有意な差を認めなかったが、培養 4 日目より照射群の細胞増殖が対照群より高い増殖率を示した。培養 6 日および 8 日でも照射群は対照群と比較して有意な高い細胞増殖率が見られた。

一方、照射量で比較した場合、R30G が R60G より培養 8 日で有意な高い細胞増殖率を示した。この様に GBM に放射線照射した場合には非照射細胞と比較し放射線耐性細胞として、細胞増殖が高い値を示した。いわば、放射線耐性株の中に癌幹細胞が多数存在することでその細胞が分化し、分化細胞の細胞増殖率の亢進の結果と考えられる。同様な結果として、放射線照射により stem cell の割合が増加することが報告されている<sup>24)</sup>。さらに、われわれの研究結果においても放射線照射量増加により、CD133<sup>+</sup>細胞含有率が増加している。通常、CD133<sup>+</sup>細胞含有率が増加しているということは、stem cell が増加していることと一致する。しかしながら、stem cell は G0 期に存在すると考えられるため細胞増殖率は放射線照射量の増加と共に低下することが予想される。細胞増殖は CSC が分化し増殖した結果であり、放射線照射細胞である R30G で増殖率は最も高くなったと考えられた。

今回の SP 細胞解析では A172 細胞は非照射群と比較し、照射群の細胞は R30G で約 2 倍から 2.5 倍の SP 細胞の検出があった。しかし、T98G 細胞では非照射細胞でも 25.3% で、この値は一般的に癌細胞で検出される SP 細胞と比べ約 100 倍の高い値であり、元々 T98G 細胞は CSC を多く含む細胞であ

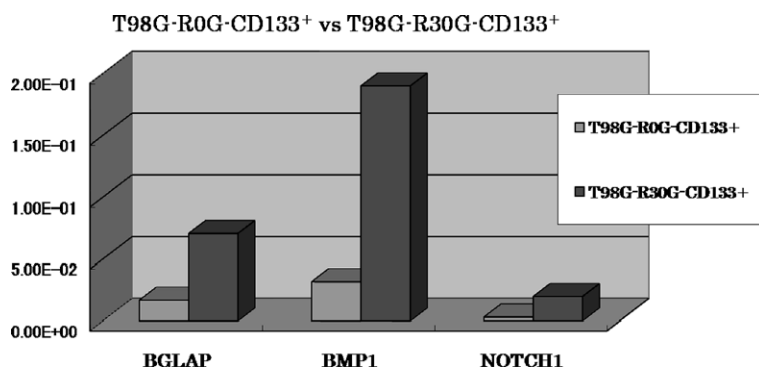


Fig. 8 Analysis of CD133 positive cells in T98G cells Compared to unirradiated cells (T98G-R0G-CD133<sup>+</sup>), 30 Gy-irradiated cells (T98G-R30G-CD133<sup>+</sup>) expressed higher levels ( $p < 0.05$ , Student's unpaired t-test) of BGLAP, BMP1 and NOTCH1.

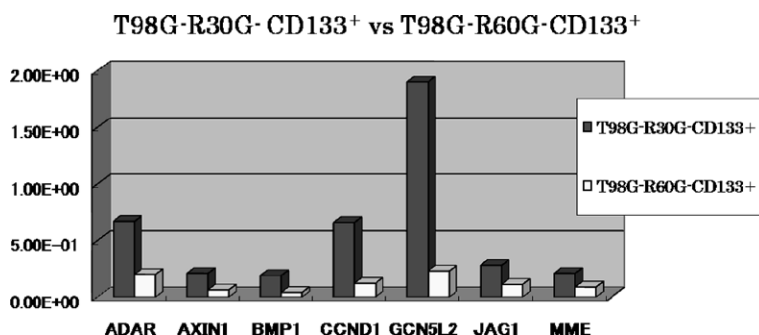


Fig. 9 Analysis of CD133 positive cells in T98G cells Compared to 60Gy-irradiated cells (T98G-R60G-CD133<sup>+</sup>), 30 Gy-irradiated cells (T98G-R30G-CD133<sup>+</sup>) expressed lower levels ( $p < 0.05$ , Student's unpaired t-test) of ADAR, AXIN1, BMP1, CCND1, GCN5L2, JAG1 and MME.

ることが判明した。したがって、フローサイトメトリーでの SP 細胞検出では verapamil の細胞毒性、検体細胞環境による違いなどにより有意な差を認めなかったと考えられた。また、CD133<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>細胞分離を行った結果、A172 の CD133<sup>+</sup>細胞含有率は放射線照射により明らかな変化は認められなかったが、T98G では放射線照射量の上昇に従い、軽度上昇が確認された。CD133<sup>+</sup>細胞が CSC 様であるという報告もあり、現在のところ CD133 は最も信頼され使用されている GBM の腫瘍幹細胞マーカーとなっている<sup>25)</sup>。また Bao らが放射線照射による CD133<sup>+</sup>細胞の割合が上昇するとの報告<sup>24)</sup>と一致する結果であった。さらに、分離した細胞の免疫染色を行った結果、腫瘍マーカーとされる CD133 や接着因子である CD44, Nestin では陽性が認められ、

分離された細胞が腫瘍幹細胞様細胞を多く含有することが確認された。しかし、その細胞が分化を開始すると、染色は認められなくなった。これは幹細胞様細胞の特徴を失ったことが考えられる。

以上の結果より、放射線照射した細胞の中には多くの CSC の存在が示唆されたが、様々な CSC のマーカーや検出方法を使用した検索結果でも有意な CSC であるとする証拠が十分ではないと考えられる。実際に CD133<sup>-</sup>細胞群から腫瘍形成能が確認された Glioma や non-SP 細胞から SP 細胞が生じた報告がされている<sup>15, 26)</sup>。そのため腫瘍細胞の構成は研究報告と共に変化してきたと考えられる (Fig. 10)。

一方、放射線耐性細胞株について遺伝子解析をした結果、T98G 細胞における R0G と R30G の比較で、R30G が有意に増強を認めた遺伝子は cell adhesion



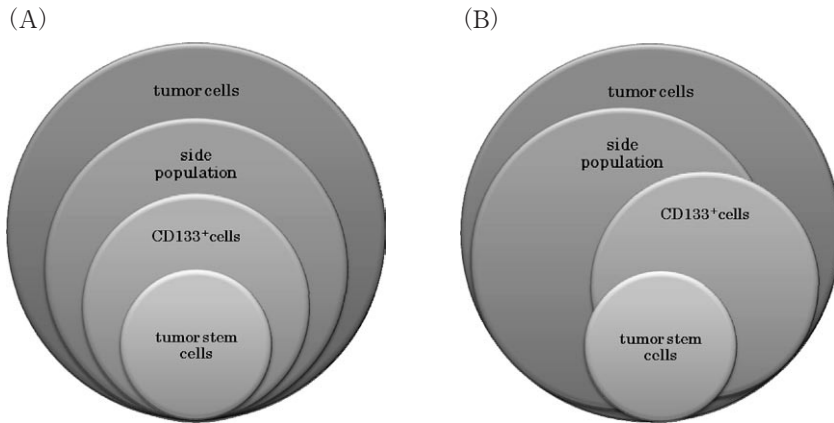


Fig. 10 Constitution of tumor cells  
(A) Old type, (B) New type

molecules, mesenchymal cell lineage markerであるBGLAP, cytokines and growth factorであるBMP1, genes regulating symmetric/asymmetric cell division, notch pathwayであるNOTCH1の3つであった。R30GとR60Gの比較でR30Gが有意に抑制を認めた遺伝子はWNT pathwayであるADAR, WNT pathway, cell cycle regulatorであるAXIN1, CCND1, cytokines and growth factorであるBMP1, cytokines and growth factor, genes regulating cell-cell communication, Notch pathwayであるJAG1, chromosome and chromatin modulator, Notch pathwayであるGCN5L2, hematopoietic cell lineage markerであるMMEの7つであった。

また有意差の検討が可能であったT98G細胞で、細胞増殖曲線と合わせて検討すると、R30Gでstem cell関連遺伝子発現が最も増強し細胞増殖が活発であった。本来、stem cell関連遺伝子発現が増強するならば、G0期に存在するstem cellが増加すると考えられる。従って、細胞増殖率は低下することが予想される。しかしこれとは逆の結果が得られており、G0期以外に存在する前駆細胞が増加しているのではないかと推測された。これに伴いstem cell関連遺伝子発現の増強が認められ、細胞増殖も活発になっているのではないだろうか。さらには、この仮定から放射線30Gy照射前後において化学療法の効果が高い可能性が推測される。R60Gではstem cell関連遺伝子の発現減弱が認められたことは、前述とは逆にG0期に存在するstem cellが増加して

いると推測され、これは放射線60Gy照射によりstem cellそのものやNiche<sup>27, 28)</sup>にダメージが及んだ可能性が推測される。

以上より放射線照射によりCSCの遺伝子発現に変化が生じ、治療抵抗性や治療効果に影響を及ぼしていると考えられる。GBMは症例により様々で、すべてに有効な治療法の確立は極めて困難と考えられ、臨床では個々の治療法を検討していく必要が出てくることも予想される。今後、腫瘍内のstem cell数や遺伝子発現を測定することにより、放射線・化学療法抵抗性、腫瘍悪性度、予後評価などへ応用が期待できる。悪性腫瘍を治癒させるにはCSCのみを死滅させれば十分と考えられるが、正常幹細胞と同様に細胞周期がG0期にあり、DNA修復能や薬剤排出能が高いためCSCを選択的に死滅させるか分化誘導させることが必要である。しかし、研究が進むにつれ現在ではCSCを治療targetとすること自体が困難であるという考えが出てきているのも事実である。

今後はstem cell関連遺伝子の評価が治療の一助となる可能性があると考えられる。またさらなるstem cell markerの検索や、生存率の改善を目指し標準治療に加えて個別化治療の研究にも期待したい。

## 文 献

- 1) Stewart LA: Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised

- trials. *Lancet* **359** : 1011-1018, 2002.
- 2) Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, *et al*: American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. *J Clin Oncol* **17** : 3333-3355, 1999.
  - 3) Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, *et al*: Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* **49** : 333-343, 1978.
  - 4) Kristiansen K, Hangen S, Kollevold T, *et al*: Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer* **47** : 649-652, 1981.
  - 5) Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al*: Glioma stem-cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444** : 756-760, 2006.
  - 6) Hide T, Takezaki T, Nakamura H, *et al*: Brain tumor stem cells as research and treatment targets. *Brain Tumor Pathol* **25** : 67-72, 2008.
  - 7) Holland EC: Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* **2** : 120-129, 2001.
  - 8) Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, *et al*: Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* **15** : 1311-1333, 2001.
  - 9) Zhu Y and Parada LF: The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* **2** : 616-626, 2002.
  - 10) Ming GL and Song H: Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **28** : 223-250, 2005.
  - 11) Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al*: Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* **432** : 396-401, 2004.
  - 12) Bonnet D and Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3** : 730-737, 1997.
  - 13) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, *et al*: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 3983-3988, 2003.
  - 14) Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, *et al*: Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 15178-15183, 2003.
  - 15) Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al*: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63** : 5821-5828, 2003.
  - 16) Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A, *et al*: Stem cells and brain cancer. *Cell Death and Differentiation* **13** : 5-11, 2006.
  - 17) Fomchenko EI and Holland EC: Stem cells and brain cancer. *Exp Cell Res* **306** : 323-329, 2005.
  - 18) Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al*: Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* **432** : 396-401, 2004.
  - 19) Kondo T, Setoguchi T and Taga T: Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** : 781-786, 2004.
  - 20) Sasaki T and Sakka M: Implications of thymidine labeling index in the growth kinetics of human solid tumors. *Gann* **72** : 181-182, 1981.
  - 21) 佐々木武二, 増山祥二: 細胞動態からみた分割照射法の生物学的基礎. *癌の臨* **31** : 1502-1511, 1985.
  - 22) 福田 直, 立川哲彦, 阿部琢巳, ほか: 神経膠芽腫培養細胞の放射線照射による放射線耐性と遺伝子発現. *昭和医学会誌* **66** : 309-324, 2006.
  - 23) 桑名亮輔, 立川哲彦, 阿部琢巳, ほか: 放射線照射 glioblastoma における抗癌剤感受性と遺伝子解析. *昭和医学会誌* **69** : 297-304, 2009.
  - 24) Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al*: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444** : 756-760, 2006.
  - 25) Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, *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.
  - 26) Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, *et al*: Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456** : 593-598, 2008.
  - 27) 須田年生: 幹細胞の居場所. *細胞工学* **27** : 650-652, 2008.
  - 28) Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, *et al*: A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* **11** : 69-82, 2007.

## GENE ANALYSIS AND DYNAMICS OF TUMOR STEM CELL IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS AFTER RADIATION

Takato NAKAJO, Akiko SASAKI, Hitoshi IZUMIYAMA  
and Takumi ABE

Department of Neurosurgery, Showa University School of Medicine

Go YAMAMOTO and Tetsuhiko TACHIKAWA

Department of Oral Pathology, Showa University School of Dentistry

**Abstract** — Because glioblastoma is the most malignant central nervous system (CNS) tumor, it is very difficult to cure despite surgery and adjuvant therapy. At present, surgery, radiotherapy, and chemotherapy are combined in the treatment of each patient. However, glioblastoma have radiotherapy and chemotherapy resistance, and this is not a radical treatment. We suspect that the tumor stem cell affects the recurrence, radiotherapy resistance and chemotherapy resistance of the tumor. Many studies suggest that tumor stem cells play an important role in tumorigenesis and tumor progression. Using human glioblastoma cell lines (T98G, A172), irradiated (0 Gy, 30 Gy, 60 Gy) glioblastoma cells were prepared under the same conditions as clinical therapy. We performed the analysis of cell proliferation rate, side population analysis by FACS, isolation of CD133<sup>+</sup> cells and genetic analysis (human stem cell), using these cells. In the results of this study, the stem cell-related genes were highly expressed in the CD133<sup>+</sup> cells compared with the CD133<sup>-</sup> cells. Therefore, it suggested that the CD133<sup>+</sup> cells may contain tumor stem cells. In T98G, when compared to unirradiated cells and 60 Gy-irradiated cells, the cell proliferation rate for 30 Gy-irradiated cells tended to be higher, and stem cell-related genes were highly expressed in 30 Gy-irradiated CD133<sup>+</sup> cells. In other words, in T98G, from the viewpoint of antitumor effects, the results suggest that chemotherapy may show more effect in 30 Gy-irradiated. In this genetic analysis, we suggest that CD133<sup>+</sup> cells strongly affect tumor proliferation. In addition, CD133<sup>+</sup> cells affect the resistance and the effect of treatments because some kind of changes occur in CD133<sup>+</sup> cells after radiation.

**Key words:** stem cell, glioblastoma, gene analysis

[受付：2月10日，受理：2月18日，2010]