

# 神経膠腫幹細胞における脂肪酸結合タンパク質の発現

氏名 森廣 雄介  
所属 山口大学大学院医学系研究科 脳神経外科

平成25年 12月

# 目次

1. 表紙	1
2. 目次	2
3. 要旨	3
4. 背景	3
5. 方法	4
6. 結果	6
7. 考察	11
8. 参考文献	12

## 要旨

神経膠芽腫は脳腫瘍の中で最も急速に進行する腫瘍であり、限られた治療オプションしかないのが現状である。神経膠芽腫にも、他の多くの腫瘍と同様に、腫瘍幹細胞が存在することが示されており、神経膠芽腫の再発や化学療法抵抗性との関連が示唆されている。

脂肪酸結合タンパク質 (FABP) ファミリーは、水に不溶性脂肪酸の細胞内シャペロンで、脂肪酸により惹起される細胞応答を制御する。その中で、脳型脂肪酸結合タンパク質(FABP7)は、神経幹細胞に発現し、幹細胞性維持に関わることが示されている。本研究では、我々が新たに開発した抗FABP7抗体を用いて、神経膠腫幹細胞株および悪性グリオーマにおけるFABP7の発現局在を解析した。

患者より樹立した神経膠腫幹細胞株に対する免疫組織化学法、ウエスタン・ブロット、qPCR解析では、FABP7は細胞の核、細胞質に強い局在を示し、血清添加により分化を誘導させると、その発現は著しく減少した。

手術により摘出された神経膠腫の解析では、FABP7は膠芽腫 (gradeIV) に有意に高い発現を示すことが確認された。さらにFABP7と幹細胞マーカーの一つであるSox2の二重免疫染色では、FABP7陽性Sox2陽性細胞が、びまん性星細胞腫や退形成性星細胞腫に比べて、膠芽腫で著しく増加していた。

これらの結果から、FABP7は神経膠腫幹細胞のマーカーであり、神経膠腫の診断や治療における標的分子となる可能性が示唆された。

## 背景

神経膠芽腫(GBS)は急速に進行する脳腫瘍で治療オプションも少ない。未だ予後は悪く、外科的手術に放射線化学療法を併用しても生存期間の中央値はおおよそ15ヶ月程度である<sup>1</sup>。治療効果改善のためにはこの疾患のより深い分子理解が求められている。これまでの幹細胞の研究では他の腫瘍と同様に、GBSにも腫瘍幹細胞が確認されている<sup>2-4</sup>。神経膠芽腫の腫瘍幹細胞(GSCs)の細胞周期は長く、その多くは静止期にあり、腫瘍内の低酸素環境に存在するため腫瘍に対する治療から逃れることができている<sup>5</sup>。従来、CD133、CD44、nestin、Sox2、Musashi等の幹細胞マーカーの共発現している細胞がGSCsとして広く用いられてきた<sup>6</sup>。

FABPは哺乳類には10種類のisoformがあり、長鎖脂肪酸の細胞内シャペロンとして働く。FABP familyの中でもFABP 7とFABP 5は発達過程における神経幹細胞やradial glialに豊富に発現しており<sup>7</sup>、FABP 7は神経幹細胞マーカーとして広く用いられている。成体マウスの脳ではFABP 7やFABP 5はastrocyteやoligodendrocyte



の前駆細胞に局在している<sup>8</sup>。これらのFABPが神経細胞の分化や増殖の調節に関わっていることはこれまでに示されているが、そのメカニズムについては正確な働きはいまだ解明されていない<sup>8,9</sup>。また、近年になりFABP 7がglioblastoma患者の生存期間短縮に関与していたり、培養したglioma stem cellに優位に発現していることが示された<sup>10,11</sup>。

今回FABP 7の実験をするにあたり、我々が新たに開発した抗FABP 7抗体や患者の腫瘍組織から作製したglioma stem cell line(GSC line)を使用し、免疫組織化学法やWestern blotting、qPCRなどにより評価を行った。

## 方法

### ・ Tumor samples and development of patient-derived GSC lines

gliomaの組織は山口大学医学部付属病院でgliomaと診断され、1996年から2012年までに腫瘍摘出術を受けた患者から採取された。診断はその後腫瘍病理医により確認され、WHOの分類に従ってgradeが決められた。Western blotには20検体（glioblastoma 16例、oligodendroglioma 2例、anaplastic astrocytoma 1例、anaplastic ganglioglioma 1例）と正常脳組織が、免疫組織化学には34標本（glioblastoma 18標本、anaplastic astrocytoma 8標本、diffuse astrocytoma 8標本）が用いられた。これらの標本の男女の内訳は男性23、女性11で、年齢は17才から80才(平均56才)であった。

この研究はヘルシンキ宣言にのっとり、インフォームドコンセントはすべての患者に行われ、IRBにより承認された。

今回用いたGSC lineのG144はDr. Peter Dirks(Arthur and Sonia Labatt Brain Tumor Research Center, Toronto, Canada)<sup>12</sup>より提供を受けた。Y02、Y04、Y10はGBMと診断された3名の摘出標本から作製した<sup>13</sup>ものを使用した。

### ・ Transplantation of GSCs into NOD-SCID mouse brain

マウスを用いたすべての実験手技は山口大学の実験動物施設で行われた。今回の研究では成体のNOD-SCIDマウス(体重20-25g、4-12週齢)が用いられた。マウスの麻酔はケタミン、キシラジンの腹腔内投与で行われた。ハミルトンシリンジと30G針でGSCs 100000個/2 $\mu$ L cold PBSを右被殻に注入した。注入は2分かけて行い、5分間留置したのちに抜去した。マウスをケージに戻してモニタリングした。脳腫瘍による症状出現時、もしくは移植後22週間のタイミングで脳標本を摘出した。すべての切片はH-E染色された。一次抗体には抗FABP抗体(1:100)を用い、ビオチン化抗ウサギIgG抗体(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, 1:200)と反応させた。抗体反応の可視化にはABC system(Vector Laboratories)を使用した。



#### ・ Immunostaining

FABP 7とSox 2の免疫二重染色は既に報告されている手順に多少の改変をくわえて行った<sup>24</sup>。腫瘍標本は10%ホルマリン添加リン酸バッファーで脱水され、パラフィン包埋された。脱パラフィン後水洗し、HISTOFINE (Nichirei, Tokyo, Japan)を用いて電子レンジで40分加熱した。TPBSで5分洗浄し、Protein Block Serum-Free Ready-To-Use (Dako Japan, Tokyo, Japan)で10分、ウサギ抗FABP 7抗体(1:300)で60分、アルカリフォスファターゼ結合ロバ抗ウサギIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA, 1:50)で30分処理された。色素生成反応にはVulcan Fast Red Chromogen Kit2 (BIOCARE MEDICAL, Concord, CA, USA)を使用した。enaturing Solution (BIOCARE MEDICAL)でアルカリフォスファターゼを失活させ、ヤギ抗Sox2抗体(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, 1:100)で処理したのちアルカリフォスファターゼ結合ロバ抗ヤギIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA, 1:50)で処理した。色素生成反応にはPermaBlue/AP (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA)を使用した。切片は風乾したのちにカバーガラスをかけた。200以上の腫瘍細胞をランダムに選択して観察し、染色度合いをabsent、weak、moderate、strongの4段階にランクづけた。

細胞は4%パラホルムアルデヒドで15分固定し、0.2%Triton X-100添加PBSで30分透過処理された。ブロッキングは5%スキムミルクもしくはヤギ血清で30分室温で行った。一次抗体はウサギ抗FABP 7抗体(1:50)と、マウス抗nestin抗体(1:200)もしくはヤギ抗Sox-2抗体(1:500)を用いて4°C、over nightで行った。二次抗体はAlexa Fluor 488ヤギ抗ウサギIgG抗体、Alexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG抗体、Alexa Fluor 568ヤギ抗ウサギIgG抗体、Alexa Fluor 568ロバ抗ヤギIgG抗体(Invitrogen, 1:1000)のそれぞれ対応するものを用いた。

#### ・ Western blotting

組織や細胞は100 mM Tris-Cl、4% SDS、20% グリセロール、200 mM  $\beta$ メルカプトエタノールを混合したバッファーで溶解した。タンパクはBCA Protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA)を用いてViento multi-spectrophotometerの562 nmで定量した。同量のタンパク(15-30  $\mu$ g)をSDS-PAGEで電気泳動し、Immobilon PVDF membranes (Millipore)に転写し、5% スキムミルクもしくはウサギ血清添加TBST (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)でブロッキングした。一次抗体反応はブロッキングバッファー中で行い、抗体には抗FABP7抗体 (1:1000)、抗nestin抗体 (Millipore, 1:5000, MAB5326)、抗Sox2抗体 (1:1000)、抗FABP5抗体 (1:1000)、抗 $\beta$ -actin 抗体(Santa Cruz Biotechnology, 1:5000, sc-47778)を使用した。



blotを洗浄し、horseradish peroxidase結合二次抗体を用いて室温で1時間反応させた。タンパクのバンドはECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare UK Ltd, Amersham Place, Little Chalfont, England)を用いて可視化した。

#### ・ RNA preparation and Real Time PCR

RNAはTRIzolのマニュアルに沿って分離され、DNase(Promega Corporation, Madison, WI, USA)処理ののちフェノール、クロロホルム、塩化リチウムを用いて再抽出した。RNA濃度は*Qubit* fluorometer (Invitrogen)の*Quant-iT RNA BR Assay kit*を用いて測定した。一本鎖cDNAの合成はoligo d(T)プライマーを用いて Transcriptor High Fidelity reverse transcriptase kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)で行った。qPCRにはTaqman Universal PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)、Taqman Gene Expression Assays for *FABP7* (Hs00361426\_m1)、*GAPDH* (Hs99999905\_m1)を使用した。反応には96-wellのプレートを用いてStepOnePlus Real-TimePCR System (Applied Biosystems)で行った。

#### ・ Statistical analysis

全ての数値データは平均±SEMで表示した。PCRにおいて2群の比較には対応のないスチューデントt検定を用いた。免疫組織化学法の解析には全ての群で1要因の分散分析とDunett's testを行った後に2要因の分散分析を用いた。P<0.05で有意差ありと判定した。

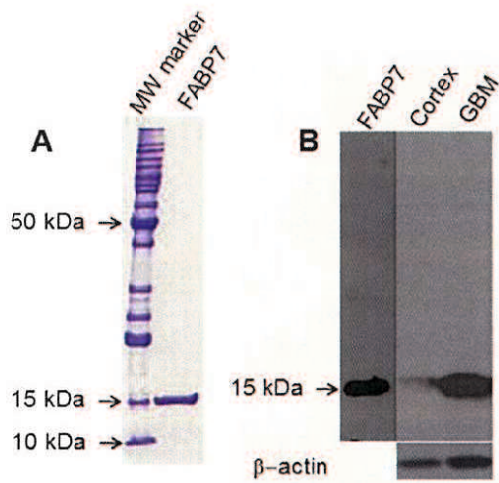
## 結果

#### ・ Sensitivity and specificity of anti-FABP7 antibody

電気泳動後にクマシー染色を行うとFABP7として期待される分子量にバンドが確認された(15kDa、Fig. 1a)。ウエスタンブロットではヒト正常脳皮質、glioma標本それぞれから15kDaの位置にバンドが確認された。

**Figure 1** Characterization of an anti-human FABP7 antibody. (a) SDS-PAGE followed by Coomassie staining shows the expected molecular weight (MW) of the recombinant FABP7 (15 kDa). (b) Western blotting showing the sensitivity and specificity of the anti-FABP7 antibody by positive immunoreaction with recombinant human FABP7,

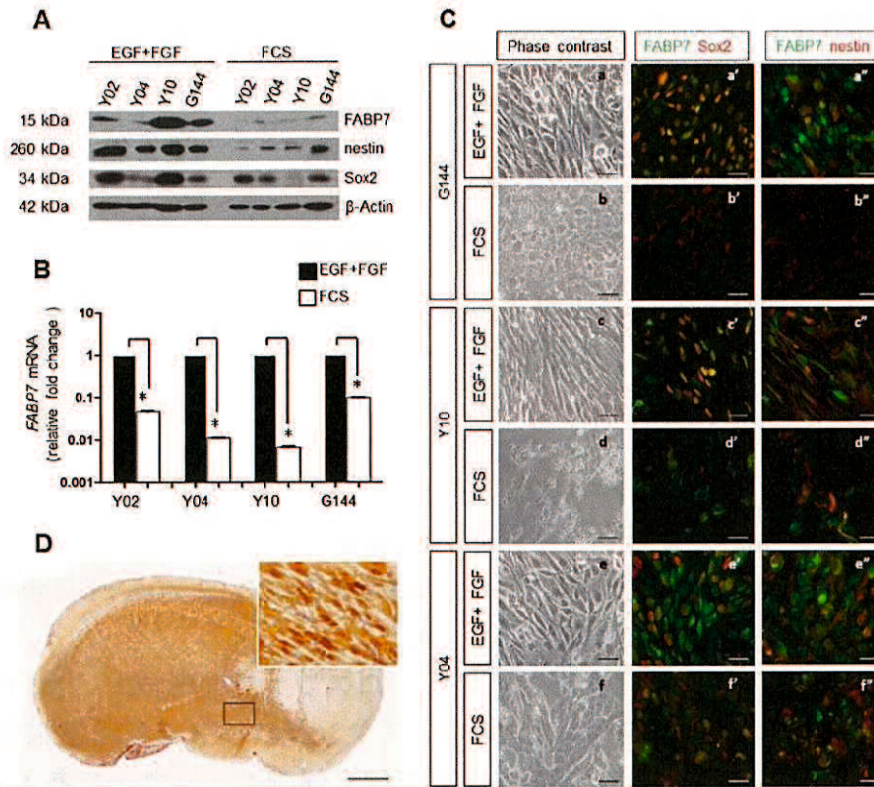




#### ・ Characteristics of GSC lines

我々はGSCsをgliomaの摘出標本から培養し、3つのcell line (Y02,Y04,Y10)を樹立した。確認のためG144 cell lineも同時に使用した<sup>12</sup>。

これらY02、Y04、Y10のいずれにおいてもニューロスフェアを形成し、多分化能や腫瘍形成能を持つことが確認された<sup>13</sup>。ウエスタンブロットや免疫細胞化学法ではこれらのcell lineではEGF、FGFの存在下で神経幹細胞マーカであるnestinやSox2が発現しており(Fig. 2)未分化な状態であるとともに、分化したglia細胞のマーカの一つであるGFAPの発現は見られなかった。幹細胞性を失わせると神経幹細胞マーカの発現強度が低下した。



**Figure 2** Expression of FABP7 in GSC lines before and after differentiation and in the NOD-SCID mouse brain after GSC transplantation. **(A)** Western blotting and **(B)** qPCR results showing the strong expression of FABP7 together with other neural stem cell markers, Sox2 and nestin, in 4 GSC lines in the presence of EGF and FGF. Upon differentiation in the presence of FCS, FABP7 expression is down regulated similar with that of Sox2 and nestin. **(C)** Expression of FABP7 in GSC lines before and after differentiation. **(a-f)** Phase contrast micrographs showing the morphology of GSC lines (G144, Y10, and Y04) in the presence of EGF and FGF **(a,c,e)** or after differentiation in the presence of FCS **(b,d,f)**. **(a'-f', a''-f'')** Immunofluorescence micrographs showing the co-expression of FABP7 and Sox2 **(a'-f')** and co-expression of FABP7 and nestin **(a''-f'')** in GSC lines G144, Y10, and Y04, respectively. **(D)** Localization of FABP7 in the mouse brain transplanted with Y10 GSCs. An inset shows high magnification image of the area enclosed by rectangle. Bars in **C** = 50  $\mu$ m, Bars in **D** = 1 mm, \* $P < 0.05$ . ■, EGF+FGF; □, FCS.



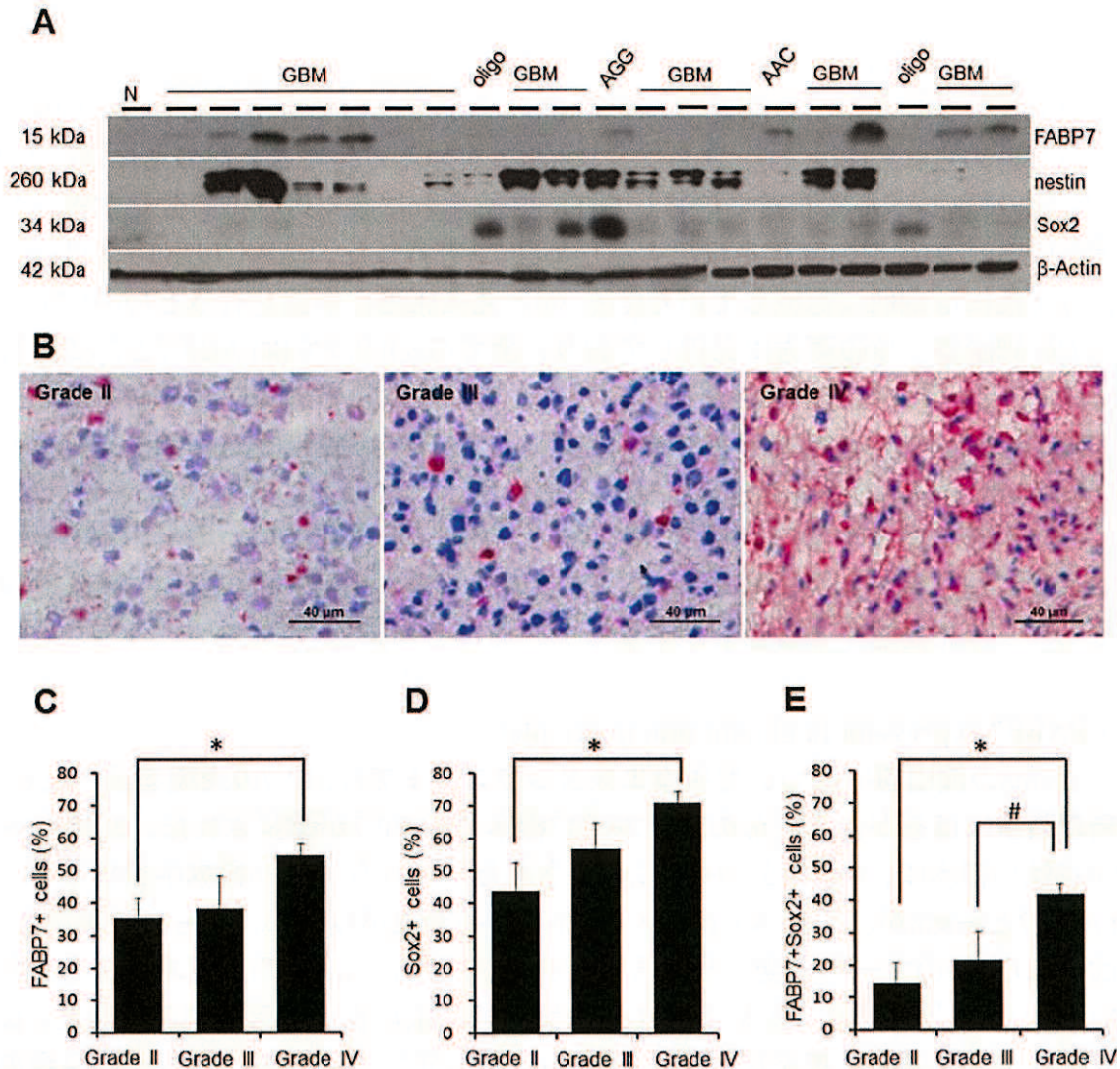
#### ・ FABP7 expression in GSC lines

ウエスタンブロットでは全てのGSC lineにおいてばらつきはあるものの強い発現が認められた(Fig. 2a)。さらに、10%FCSを加えて分化させたのちにはFABP 7のタンパクレベルは明確に低減した(Fig. 2a)。さらに我々はGSCの分化前後におけるFABP 7の発現の変化を検討するためqPCRを行った。FABP 7のmRNAはGSCの分化後には劇的に低減していた(Fig. 2b)。免疫細胞化学法を行うとFABP 7はGSCの細胞質、核の両方に発現しており、全てのcell lineではFABP 7とSox2もしくはnestinとの共発現が相当量見られたが、これらは分化誘導により著明に減少した(Fig. 2c)。GSC移植モデルマウスを用いてFABP 7の免疫組織化学法を行うと(Fig. 2d)、nestinの分布と非常に似通っていた<sup>13</sup>。

他にも脳に発現するFABPとしてFABP 5があるが、これについてもGSCにおいて調査した。興味深いことにGSCにおいてはFABP 7と比較してFABP 5は低発現であり、分化誘導すると発現が増加していることが確認された。

#### ・ FABP7 expression in glioma tumor samples

gliomaの摘出標本についてもウエスタンブロットでFABP 7の発現を調べた。発現強度には差があるものの20標本中17標本でFABP 7が確認された。20標本中Sox2は15標本に、nestinは17標本に確認された。これらは、20標本中14標本でFABP 7とnestinが、13標本でFABP 7とSox2の共発現がみられ、さらに12標本ではこれら3つのマーカー全てが発現していた(Fig. 3a)。glioma病理標本34標本においてFABP 7とSox2の二重免疫染色を行うと、Gradeに従い腫瘍細胞の細胞質、核における発現強度に差が見られた(Fig. 3b)。これまでに核におけるSox2の発現の違いについては既に報告されている<sup>14</sup>。FABP 7陽性腫瘍細胞とSox2陽性腫瘍細胞数はGrade 2(diffuse astrocytoma)と比較してGrade 4(GBM)で有意に上昇していた(Fig. 3b-d,  $P < 0.05$ )。全腫瘍細胞に対するFABP陽性Sox2陽性細胞の割合はGrade 2またはGrade 3(anaplastic astrocytoma)と比較して有意に上昇していた(Fig. 3b,e,  $P < 0.05$ )。Sox2陽性細胞はGBMで発現強度が高く<sup>14</sup>、FABP 7は基本的にこれと相関したが、いくつかのサンプルではその発現は確認できなかった。加えて、FABP7陽性Sox2陽性細胞は血管周囲に、FABP 7が核に局在する細胞は腫瘍先進部に多くみられ、これまでの報告と矛盾しなかった<sup>15</sup>。



**Figure 3** Expression of FABP7 in human glioma samples. (a) Western blotting showing the expression of FABP7, nestin, and Sox2 in surgically resected glioma samples including GBM, oligodendroglioma, anaplastic ganglioglioma, and anaplastic astrocytoma. Note the difference in expression levels of FABP7, nestin and Sox2 in the different samples. Expression of  $\beta$ -actin was shown as an internal control. (b) Representative photomicrographs showing FABP7 and Sox2 immunoreactivity in different grades of human glioma. Note that Sox2 expression (blue) is confined to the nuclei, and that FABP7 (red) is in both cytosol and nuclei. (c,d,e) Population density of FABP7+ (c), Sox2+ (d), and FABP7+Sox2+ tumor cells (e) in different grades of human glioma.



## 考察

今回の研究では新たに開発した抗体とGSC lineを用いたが、ウエスタンブロット、qPCR、免疫細胞化学法でFABP 7はGSCに豊富にみられ、幹細胞性を失うとその発現が低下していた。これらの結果からはFABP 7はSox2やnestinなどと同様にGSCのマーカーとなる可能性が示された。

現在のわれわれの研究では幹細胞性が失われてもFABP 7やSox2、nestinは発現低下は見られるものの完全には消失しないことを確認している。これによりGSCを分化培養することで非対称細胞分裂や増殖的分化をすることが示された<sup>16</sup>。残存した幹細胞マーカーはGSCが分化培養液中でも残存しているためと考えられる。これはNS細胞の培養に対して、GSCは血清培養により確立されたglioma lineでもneurosphere回復アッセイを用いて無血清培地でneurosphereに変換できることを示す<sup>17</sup>。

我々のデータからはFABP 7とそのリガンドはGSCの分化および維持において調節的役割を持つことを示唆している。注目すべきことに、FABP7は神経上皮細胞に幹細胞性の調節因子として報告されている<sup>9</sup>。FABP 5はGSCでの発現は弱く、分化により発現が増強し、FABP 7とFABP 5は交互的な発現を示すことはGSC分化の段階により細胞内での脂質代謝の違いを反映しているのかもしれない。FABP 5やFABP 7はそのリガンドの結合親和性（FABP 5は飽和脂肪酸、FABP 7は $\omega$ -3多価不飽和脂肪酸(PUFA)）により生化学的に変化する<sup>18</sup>。したがって、腫瘍組織のニッチェに存在するGSCは $\omega$ -3 PUFAの関連する細胞内脂質代謝の特定の条件下において幹細胞性を維持できるといえる。この、FABP 7とそのリガンドのGSCへの調節的役割の仮説は現在我々の研究室で研究がつつけられている。加えてGSCにおけるFABP 7の発現は、GBMの浸潤性とFABP 7との関連<sup>10,19</sup>や、GCSがGBMの浸潤の主な原因である<sup>20,21</sup>との報告を部分的に説明できるかもしれない。

幹細胞マーカーである細胞表面抗原CD 133や、幹細胞の転写因子であるSox2やOct 4、NanogはGSCの生存や増殖、多分化能の維持に重要な役割を果たしている<sup>22,23</sup>。これらのタンパクのうち、GSCにおけるSox2の発現レベルは、マウスの移植モデルにおいて自己再生活性や腫瘍形成能に関連することが示された<sup>14</sup>。さらには、Sox2の発現レベルや分布がヒトグリオーマの悪性度や予後に関連することも示されている<sup>24</sup>。今回の研究ではFABP 7陽性Sox2陽性腫瘍細胞の割合がGBMで著明に増加しており、FABP 7の局在パターンがSox2のパターンとよく相関していた。FABP 7陽性Sox2陽性腫瘍細胞は血管周囲領域や腫瘍先進部に多く存在し、この領域はヒトグリオーマにおいて幹細胞マーカー陽性腫瘍細胞の局在パターンとして立証されているものである<sup>25,26</sup>。したがってヒトグリオーマの病理的検討によりFABP 7はSox2などの幹細胞マーカーと併せてGSCを同定する



有用なマーカーであるといえるであろう。

我々のデータからはFABP 7はGSCのマーカーおよび調節因子の候補として導かれた。GBMにおけるFABP 7の機能のさらなる研究はFABP 7がGBMの進行をコントロールする機序や、GBMの診断および治療の標的としての意義に光を照らすものと考えられる。

## 参考文献

- 1 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987–96.
- 2 Toda M, Iizuka Y, Yu W *et al.* Expression of the neural RNA binding protein Musashi1 in human gliomas. *Glia* 2001; **34**: 1–7.
- 3 Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stemlike cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia* 2002; **39**: 193–206.
- 4 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; **432**: 396–401.
- 5 Galli R, Binda E, Orfanelli U *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; **64**: 7011–21.
- 6 Gursel DB, Shin BJ, Burkhardt JK, Kesavabhotla K, Schlaff CD, Boockvar JA. Glioblastoma stem-like cells-biology and therapeutic implications. *Cancers (Basel)* 2011; **3**: 2655–66.
- 7 Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H. Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. *J Chem Neuroanat* 1996; **12**: 113–22.
- 8 Sharifi K, Morihiro Y, Maekawa M *et al.* FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. *Histochem Cell Biol* 2011; **136**: 501–13.
- 9 Arai Y, Funatsu N, Numayama-Tsuruta K, Nomura T, Nakamura S, Osumi N. Role of Fabp7, a downstream gene of Pax6, in the maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex. *J Neurosci* 2005; **25**: 9752–61.
- 10 Kaloshi G, Mokhtari K, Carpentier C *et al.* FABP7 expression in glioblastomas: Relation to prognosis, invasion and EGFR status. *J Neurooncol* 2007; **84**: 245–8.
- 11 Liang Y, Bollen AW, Aldape KD, Gupta N. Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed in infiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. *BMC Cancer* 2006; **6**: 97.



- 12 Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID *et al.* Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 568–80.
- 13 Sadahiro H, Yoshikawa K, Ideguchi M *et al.* Pathological features of highly invasive glioma stem cells in a mouse xenograft model. *Brain Tumor Pathol* 2013; DOI 10.1007/s10014-013-0149-x.
- 14 Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 2011; **8**: 139–47.
- 15 Mita R, Coles JE, Glubrecht DD, Sung R, Sun X, Godbout R. B-FABP-expressing radial glial cells: The malignant glioma cell of origin? *Neoplasia* 2007; **9**: 734–44.
- 16 Lathia JD, Hitomi M, Gallagher J *et al.* Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis* 2011; **2**: e200.
- 17 Mihaliak AM, Gilbert CA, Li L *et al.* Clinically relevant doses of chemotherapy agents reversibly block formation of glioblastoma neurospheres. *Cancer Lett* 2010; **296**: 168–77.
- 18 Hanhoff T, Lucke C, Spener F. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol Cell Biochem* 2002; **239**: 45–54.
- 19 Mita R, Beaulieu MJ, Field C, Godbout R. Brain fatty acidbinding protein and omega-3/omega-6 fatty acids: Mechanistic insight into malignant glioma cell migration. *J Biol Chem* 2010; **285**: 37005–15.
- 20 Inoue A, Takahashi H, Harada H *et al.* Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *Int J Oncol* 2010; **37**: 1121–31.
- 21 Yu SC, Bian XW. Enrichment of cancer stem cells based on heterogeneity of invasiveness. *Stem Cell Rev* 2009; **5**: 66–71.
- 22 Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, Pelicci G. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells* 2013; **31**: 857–69.
- 23 Huang Z, Cheng L, Guryanova OA, Wu Q, Bao S. Cancer stem cells in glioblastoma-molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* 2010; **1**: 638–55.
- 24 Gangemi RM, Griffero F, Marubbi D *et al.* SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 2009; **27**: 40–48.
- 25 Christensen K, Schroder HD, Kristensen BW. CD133 identifies perivascular niches

in grade II-IV astrocytomas. *J Neurooncol* 2008; **90**: 157–70.

26 He H, Li MW, Niu CS. The pathological characteristics of glioma stem cell niches. *J Clin Neurosci* 2012; **19**: 121–7.