

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591576

研究課題名（和文） 悪性腫瘍に対する血管内皮前駆細胞を用いた血管新生抑制療法

研究課題名（英文） Antiangiogenic therapy using endothelial progenitor cells for malignant tumors

研究代表者

高野 晋吾（TAKANO SHINGO）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号 50292553

研究成果の概要：

悪性脳腫瘍の血管新生には血管内皮前駆細胞(EPC)および正常内皮細胞とは遺伝子発現、機能が違う膠芽腫由来の血管内皮細胞が重要な役目を担っていることを、*in vitro* および *in vivo* で明らかにした。VEGF 中和抗体および CXCR7 中和抗体・SDF-1 抑制剤である AMD3100 が膠芽腫血管新生を抑制した。SDF-1/CXCR7 は同時に膠芽腫の浸潤にも関与し、その抑制剤により血管新生抑制の耐性機序のひとつである腫瘍浸潤の増強も抑制した。膠芽腫血管新生抑制療法として現在使われ始めた VEGF 中和抗体と併せて SDF-1/CXCR7 を抑制する戦略が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学、血管新生、血管内皮前駆細胞、ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫の増殖制御には血管新生の抑制が必須であり、腫瘍血管に動員される EPC を抑制剤の delivery tool とした。特に末梢血ではなく臍帯血から分離した EPC は機能的に delivery tool として適していると考えられた。EPC を用いた新しい方式による血管新生

抑制療法を考案した。

## 2. 研究の目的

臍帯血 EPC の生物学的特性を評価し、脳腫瘍モデルでの EPC の関与を測定する。EPC に血管新生抑制遺伝子を導入し、脳腫瘍モデルでの増殖抑制を評価する。膠芽腫由来の内皮細胞 (GBMEC) を腫瘍組織から分離培養

し、膠芽腫に特異的な血管新生抑制療法を考案する。

### 3. 研究の方法

- (1) 臍帯血 EPC の生物学的特性
- (2) EPC の脳腫瘍への関与
- (3) EPC への血管新生抑制遺伝子の導入
- (4) ケモカイン：SDF-1/CXCR4 を標的とした血管新生抑制療法
- (5) 膠芽腫由来血管内皮細胞 (GBMEC) の分離培養

### (6) GBMEC の機能解析

### 4. 研究成果

- (1) 臍帯血 EPC の生物学的特性:末梢血 EPC に比べて増殖能、遊走能が高く低酸素状態で VEGF, CXCR4 の発現が高い。
- (2) EPC の脳腫瘍への関与：EPC を GFP(green fluorescence protein)でラベルする。ヒト悪性グリオーマ細胞の皮下腫瘍モデルで、尾静脈から EPC を静注し腫瘍内での EPC の分布を顕微鏡で観察した。EPC 投与後 24 時間で EPC は腫瘍内に遊走し、72 時間まで広範に分布する。その後、11 日、26 日後にはグリオーマの腫瘍血管にホーミングし、腫瘍内では低酸素領域に局在していた。組織学的には微細な腫瘍血管網が発達し(図 1 A)、定量ではコントロール群(図 1 B)に比べて有意に血管長が長く、低酸素領域が減少していた(図 1)。ただし VEGF, HIF-1 $\alpha$  の発現には変化はみられなかった。さらに、ラット悪性グリオーマ C6 の脳内モデルで脳内のグリオーマ腫瘍血管への EPC のホーミングを確認することができた(図 2：グリーン=GFP ラベル EPC、レッド=レクチン血管内腔)。
- (3) EPC への遺伝子導入：EPC がグリオーマ腫瘍血管にホーミングすることが明らかにされたので、次にグリオーマの血管新生抑制療法を考える上で、EPC への血管新生抑制遺伝子, soluble Flt-1(VEGF receptor) と

図 1 A EPC injected glioma vasculature

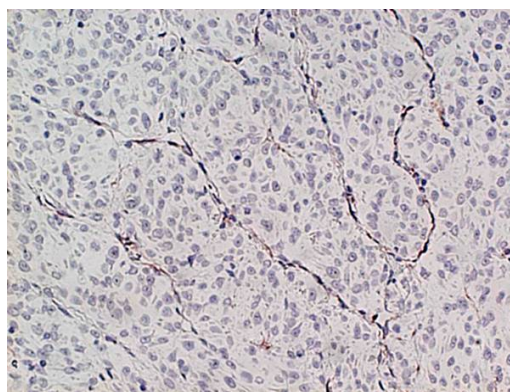


図 1 B Control glioma vasculature

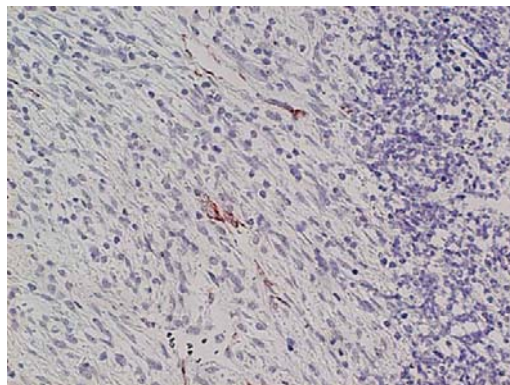
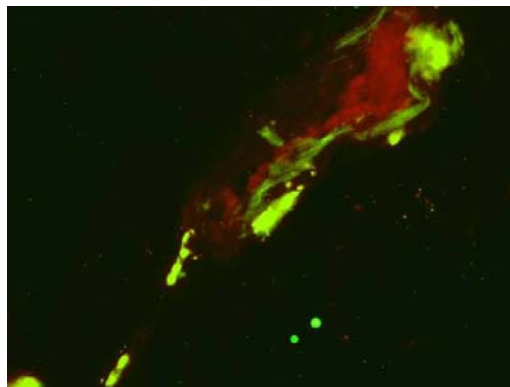


図 2 EPC homing to glioma vasculature



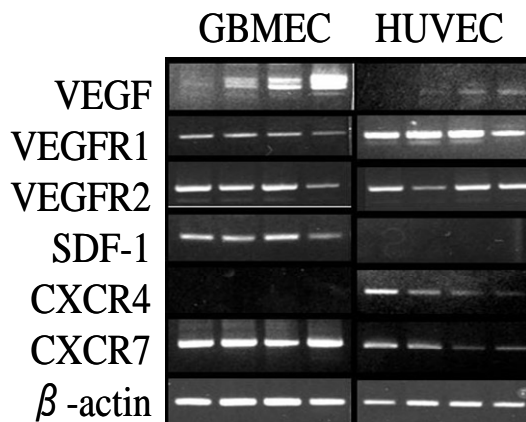
thrombospondin1 遺伝子導入に取りかかった。レトロウイルスを作成したが、パッケージング細胞への導入ができず、GFP とともに fugene 6 を用いた co-transfection でも、導入後の EPC が toxicity で生存できない状態であった。そこで、EPC への遺伝子導入ではなく、EPC の作用を抑制する方法として腫瘍血管へのホーミングに重要な SDF-1 ケモカインに注目した。

- (4) SDF-1/CXCR4 を標的とした血管新生抑

制療法：SDF1 とその受容体 CXCR4 はヒトグリオーマ組織の免疫染色では腫瘍細胞と腫瘍血管に発現がみられ、特に腫瘍辺縁より離れた血管でも SDF1 の発現がみられた。SDF1 は同時にグリオーマ細胞の浸潤能を増強するケモカインで、SDF1 の抑制剤である AMD3100、tannic acid がその浸潤能を抑制することから、SDF1 を標的とする治療はグリオーマの血管新生、浸潤を抑制する治療となりうるということが明らかにされた

(5) GBMEC の分離培養：膠芽腫 13 例から腫瘍血管内皮細胞(GBMEC)を 4 種類分離培養できた。GBMEC は正常血管内皮細胞(HUVEC)と比べて SDF-1, CXCR7 の mRNA 発現が高く、CXCR4、VEGFR1、VEGFR2 の mRNA 発現が低かった(図 3)。また、GBMEC は HUVEC に比べて多くの SDF-1 を分泌した。

図 3 Genetic differences of GBMEC



(6) GBMEC の機能解析：分離培養できた GBMEC の遊走能、管腔形成能を HUVEC と比較した。GBMEC では SDF-1 に対する遊走能、管腔形成能が HUVEC に比べて高く、SDF-1 の受容体である CXCR7 に対する抗体で遊走能・管腔形成能が抑制された(図 4)。一方、SDF-1 のもうひとつの受容体である CXCR4 の抑制剤 (AMD3100) では抑制されなかった。

図 4A GBMEC tube formation (control)

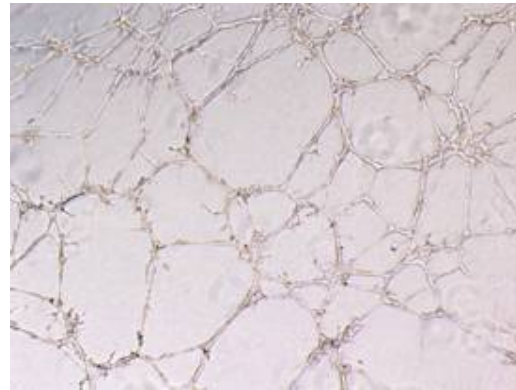
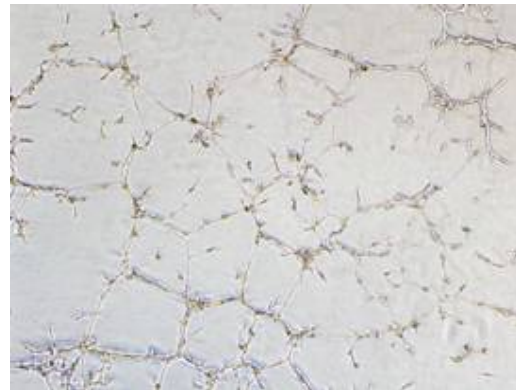


図 4B CXCR7 antibody inhibition



(7) 結語：膠芽腫の血管新生では GBMEC が SDF-1 を分泌し autocrine に CXCR7 受容体を介して遊走、管腔形成を行い、paracrine に EPC を骨髄から、膠芽腫細胞を腫瘍血管周囲に遊走させることにより腫瘍の形成を行っていると考えられた。今後は VEGF だけでなく SDF-1、CXCR7 も重要な分子標的として膠芽腫の血管新生を抑制する手段を考える必要がある。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. 高野晋吾、益子良太、大須賀覚、山本哲哉、中井 啓、鶴淵隆夫、長野真澄、山下年晴、大根田修、松村 明：グリオーマ血管内皮細胞から考えたグリオーマの治療。ニューロオンコロジー (2009 in press) (査読無)

2. 高野晋吾 : 悪性神経膠腫に対する血管新生抑制療法. Jpn J Cancer Chemother 36: 941-947, 2009. (査読無)
3. Takano S, Osuka S, Mashiko R, Ohneda O, Nagano M, Yamashita T, Matsumura A: The role of chemokine SDF-1 and CXCR4 in glioma angiogenesis and invasiveness: interaction between glioma and glioma-derived endothelial cells. Neuro Oncol 11: 219, 2009. (査読有)
4. 高野晋吾 : Angiogenesisをtargetにした神経膠腫治療(1). 脳神経外科速報 18: 1374-1385, 2008. (査読無)
5. 高野晋吾 : Angiogenesisをtargetにした神経膠腫治療(2). 脳神経外科速報 18: 1506-1515, 2008. (査読無)
6. 高野晋吾, 松村 明 : 脳腫瘍に対する血管新生抑制療法. No Shinkei Geka 34: 657-678, 2006. (査読無)

[学会発表] (計 27 件)

1. 高野晋吾, 益子良太, 大須賀覚, 山本哲哉, 石川栄一, 松村 明 : 再発悪性神経膠腫に対するベバシズマブ・イリノテカン併用療法の効果 : 症例報告. 第 17 回東京脳腫瘍治療懇話会 (2008.12.19, 東京)
2. 高野晋吾, 益子良太, 大須賀 覚, 石川栄一, 山本哲哉, 山下年晴, 大根田 修, 松村 明 : SDF-1・CXCR4 を標的としたグリオーマの浸潤・血管新生同時抑制. 第 26 回日本脳腫瘍学会(2008.11.30, 愛媛)
3. 益子良太, 高野晋吾, 大須賀覚, 大根田修, 松村 明 : 低栄養・低酸素がグリオーマ細胞死に及ぼす影響. 第 26 回日本脳腫瘍学会(2008.11.30, 愛媛)
4. 大須賀覚, 高野晋吾, 益子良太, 松村明 : グリオーマにおけるヒストン脱アセチル化酵素の発現と局在. 第 26 回日本脳腫瘍学会(2008.11.30, 愛媛)
5. 高野晋吾 : 腫瘍血管新生に関わる血管内皮細胞について : 血管内皮前駆細胞と腫瘍血管内皮細胞. 第 2 回日本血流血管学会 (2008.11.29, 水戸)
6. 秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 高野晋吾, 山下年晴, 大根田修 : グリオブラストーマにおけるHIF-2 $\alpha$ の役割. 第 6 回がんとハイポキシア研究会 (2008.11.29, 広島)
7. Takano S, Mashiko R, Nagano M, Akimoto K, Ohneda O, Osuka S, Matsumura A: Antiangiogenic therapy for glioblastomas based on the characteristics of glioblastoma derived endothelial cells. 第 68 回日本癌学会 (2008.10.28, 名古屋)
8. 高野晋吾 : グリオーマに対する血管新生抑制療法の理論と実際. 第 16 回神奈川脳腫瘍フォーラム(2008.09.05, 横浜)
9. 高野晋吾 : 悪性脳腫瘍の血管新生抑制療法の可能性. 脳腫瘍レビュー'08 (2008.06.14, 東京)
10. Shingo Takano, Satoru Osuka, Ryota Mashiko, Osamu Ohneda, Masumi Nagano, Toshiharu Yamashita, Akira Matsumura: The role of Chemokine, SDF-1 and CXCR4 in glioma angiogenesis and invasiveness: Interaction between glioma and glioma derived endothelial cells. The 17<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research and Therapy (2008.06.09, Hakodate)
11. 高野晋吾, 益子良太, 秋本恵子, 長野真澄, 大根田修, 山本哲哉, 中井 啓, 大

- 須賀覚、松村 明：グリオーマ血管新生におけるSDF-1/CXCR4ケモカインとグリオーマ由来血管内皮細胞の役割. 第26回日本脳腫瘍病理学会(2008.05.23、東京)
12. 益子良太、高野晋吾、山本哲哉、中井 啓、松村 明：グリオーマ壊死の画像とバイオマーカー；Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )発現. 第26回日本脳腫瘍病理学会(2008.05.23、東京)
13. 高野晋吾、益子良太、長野真澄、山下年晴、大根田修、山本哲哉、坪井康次、松村 明：グリオーマ血管内皮細胞から考えたグリオーマの治療. 第35回ニューロオンコロジーの会(2008.04.05、東京)
14. 高野晋吾、大須賀覚、益子良太、塚田喜子、宮川牧子、松村 明、秋本恵子、木村健一、長野真澄、山下年晴、大根田修：ヒト脳腫瘍由来血管内皮細胞および間葉系幹細胞を用いた悪性脳腫瘍の遺伝子細胞療法. 第1回筑波大学次世代医療研究開発・教育統合(CREIL)センター公開シンポジウム(2008.01.23、つくば)
15. 高野晋吾、大須賀覚、鶴淵隆夫、山本哲哉、大根田修、長野真澄、松村 明：グリオーマの浸潤およびグリオーマ由来血管内皮細胞におけるSDF-1 / CXCR4の役割. 第25回日本脳腫瘍学会(2007.12.09、東京)
16. 大須賀覚、高野晋吾、宮川牧子、野口昭三、松村 明：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤：バルプロ酸によるグリオーマの血管新生抑制効果. 第25回日本脳腫瘍学会(2007.12.09、東京)
17. 益子良太、高野晋吾、大須賀覚、宮川牧子、大根田修、松村 明：低酸素状態でのグリオーマ細胞の増殖能・遊走能・血管新生能. 第25回日本脳腫瘍学会(2007.12.09、東京)
18. 高野晋吾：血管新生を抑えて脳腫瘍を治す. 第19回医学7専攻研究セミナー(2007.12.04、つくば)
19. 高野晋吾、今川重彦、及川剛宏、河合弘二、赤座英之：悪性腫瘍に対するHIF-1/VEGFを標的としたNK細胞療法の増強方法の基礎実験. TARAプロジェクト中間評価報告(2007.11.19、つくば)
20. 大須賀覚、高野晋吾、宮川牧子、野口昭三、松村 明：バルプロ酸による血管新生抑制効果の検討. 第29回茨城てんかん懇話会(2007.06.16、つくば)
21. 高野晋吾、大須賀覚、山本哲哉、坪井康次、松村明、大根田修、長野真澄、山下年晴：血管内皮前駆細胞を用いたtranslational research: グリオーマに対する抗血管新生療法. 第2回脳腫瘍基礎シンポジウム(2007.01.20、東京)
22. 高野晋吾、大根田修、山本哲哉、坪井康次、山下年晴、長野真澄、松村 明：血管内皮前駆細胞を用いたグリオーマに対する血管新生抑制療法. 第14回日本血管生物医学会(2006.12.13、東京)
23. 宮川牧子、高野晋吾、大根田修、松村明：低酸素状態でのグリオーマ細胞の増殖能・遊走能、血管新生能. 第4回がんとハイポキシア研究会(2006.11.17、京都)
24. 大須賀覚、高野晋吾、宮川牧子、松村明：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤：バルプロ酸によるグリオーマ増殖抑制効果の検討. 第24回日本脳腫瘍学会(2006.10.01、阿寒)
25. 高野晋吾、大根田修、大須賀覚、山本哲哉、坪井康次、山下年晴、長野真澄、松村 明：血管内皮前駆細胞を用いたグリオーマに対する血管新生抑制療法. 第24

回日本脳腫瘍学会 (2006.10.01、阿寒)

26. 高野晋吾、井口雅博、山本哲哉、坪井康次、松村 明：グリオーマにおける低酸素領域：HIF-1 $\alpha$ 発現による可視化とHIF-1 $\alpha$ を標的とした化学療法による減少。第24回日本脳腫瘍病理学会 (2006.06.29、琉球)
27. 高野晋吾：悪性脳腫瘍に対するHIF-1/VEGFを標的としたNK細胞療法の増強。TARAプロジェクト研究成果報告 (2006.05.30、つくば)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高野 晋吾 (TAKANO SHINGO)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授  
研究者番号：50292553

### (2) 研究分担者

大根田 修 (OHNEDA OSAMU)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授  
研究者番号：30311872

山下 年晴 (YAMASHITA TOSHIHARU)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教  
研究者番号：50400677

依馬 正次 (EMA MASATSUGU)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
研究者番号：60359578

今川 重彦 (IMAGAWA SHIGEHICO)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授  
研究者番号：60231164

清水 崇史 (SHIMIZU TAKASHI)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
研究者番号：00338782

安部井 誠人 (ABEI MASATO)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
研究者番号：20261802

### (3) 連携研究者

なし