

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591676

研究課題名（和文）

悪性脳腫瘍幹細胞を用いた脳腫瘍動物モデルの確立と治療

研究課題名（英文）

Establishment and treatment of malignant glioma animal model using brain tumor stem cell

研究代表者

神原 啓和（KANBARA HIROKAZU）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40420484

研究成果の概要：

今回、我々は、CD133、Nestin陽性である悪性脳腫瘍幹細胞の分離、培養を行い、その性状を分析した。さらに、Nestin陽性腫瘍細胞特異的に増殖するヘルペスウイルスの調整をおこなった。現在、新たな動物腫瘍モデルの作成、ヘルペスウイルスの治療効果については検討中であるが、腫瘍幹細胞に対する治療研究は、脳腫瘍治療の新たな展開に必要な研究であると考えている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：幹細胞、増殖型ヘルペスウイルス、悪性脳腫瘍、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、診断技術・治療方法の進歩にも関わらず、依然として予後不良な疾患であり、有効な新規治療法の開発は急務である。我々はこれまで、悪性脳腫瘍に対するウイルスベクターを用いた遺伝子治療について基礎的研究を行い、その有効性を示してきたが、いずれの実験も cell line 化された細胞の移植脳腫瘍モデルを

使用したものであり、実際の悪性脳腫瘍の発育様式を再現・治療したものとは言いがたい状況であった。そこで、今回我々は、治療標的として手術摘出腫瘍から腫瘍幹細胞を分離・培養し、その細胞自身の性状や、動物に移植した際の腫瘍の発育形式を詳しく分析する。また、樹立した細胞や動物モデルに対する治療方法として、新規開発

した制限増殖型ヘルペスウイルスを用い、治療効果を検討する。これらの研究を通して、より実際の脳腫瘍に近い腫瘍細胞を用いたモデルを作成、それに対するウイルス治療の効果の証明を目指す。制限増殖型ヘルペスウイルスは、腫瘍細胞内でのみ増殖し、殺細胞効果を持ったウイルスであり、今回新規に開発したものは、脳腫瘍特異的に強い抗腫瘍効果を持ったウイルスである。

癌幹細胞の概念が提唱され、癌組織中には自己複製能、多分化能、無制限の分裂能、浸潤能を持った細胞が存在することが明らかにされ、この細胞を標的とする癌の基礎研究が盛んになり、治療の標的としても関心が高まっている。脳神経外科領域においても、悪性神経膠腫について同様な研究の報告がある。つまり、悪性神経膠腫組織から膜抗原 CD133 陽性細胞を分離したところ、その細胞はわずかな数でも動物に腫瘍を形成する能力や浸潤能を持つことを証明し、悪性神経膠腫の幹細胞である可能性を指摘しており、CD133 の他に nestin も免疫染色で陽性であることも併せて報告している。

今後は、悪性神経膠腫に対する治療法の研究には腫瘍組織中の腫瘍幹細胞 (CD133、nestin 陽性細胞) を標的としたものが注目されてくると考えられ、この細胞に対して制限増殖型ヘルペスウイルスを用いた治療法を開発していくことは今までは報告がなく独創的である。

悪性神経膠腫に対する新しい治療法として、従来の非増殖型ウイルスベクターを用いた遺伝子導入による遺

伝子治療ではなく、腫瘍特異的にウイルスが増殖することで、抗腫瘍効果を狙う制限増殖型ヘルペスウイルスを用いた治療法が開発され、多くの基礎的研究が行われ、動物実験で抗腫瘍効果、正常細胞に対する安全性が証明されている。また、ある種のウイルスでは臨床応用に向けた試みもなされている。

一方で、従来の制限増殖型ヘルペスウイルスでは、ウイルスが正常細胞内で増殖しないという安全性を得るために、ウイルスの細胞内増殖に重要である遺伝子を欠損させているため、抗腫瘍効果自体を減弱してしまっているというジレンマがあった。そのような状況下で、抗腫瘍効果を高めるため、wild type ヘルペスウイルスに存在し、多くの制限増殖型ヘルペスウイルスには欠損している、ウイルス増殖に重要な役割を担う遺伝子である $\gamma_1 34.5$ 遺伝子を腫瘍特異的に発現する新規ウイルスを開発した。このウイルスは腫瘍特異的に遺伝子発現を得るため、腫瘍特異的プロモーターである nestin promoter (悪性神経膠腫幹細胞では nestin の発現が認められる。) を用い、 $\gamma_1 34.5$ 遺伝子を発現する新しい制限増殖型ヘルペスウイルス (rQNestin34.5) である。

この rQNestin34.5 が nestin 陽性悪性神経膠腫に対して特異的に強い抗腫瘍効果を示すことを in vitro、in vivo で証明した。同時に、in vitro の結果ではあるが、ヒト培養 primary glioma cell に対しても抗腫瘍効果を示すことも証明した。このウイルスは、先に述べた nestin 陽性と報告されて

いる悪性神経膠腫幹細胞に対しても抗腫瘍効果をしめすものであると考えられる。

2. 研究の目的

CD133、Nestin 陽性である悪性脳腫瘍幹細胞の分離、培養を行い、その性状を分析し、新たな動物腫瘍モデルを作成する。次に Nestin 陽性腫瘍細胞特異的に増殖するヘルペスウイルスの治療効果をこの動物モデルを用いて明らかにする。腫瘍幹細胞に対する治療研究は、脳腫瘍治療の新たな展開に必要な研究であると考えられる。

3. 研究の方法

①悪性脳腫瘍幹細胞の分離

手術で摘出された悪性脳腫瘍細胞を初代培養し、増殖してきた細胞を Athymic mouse の皮下に注入し腫瘍を形成してくるものを培養する。これによって、増殖能力と腫瘍形成能力を持った細胞を分離し、更にその中で CD133 陽性細胞をソーティングする。こうすることで、より効率的に現在脳腫瘍幹細胞と考えられている細胞が樹立できる。Nestin、GFAP 等のマーカーについても分析を行う。上記が順調に進まない場合は、別の方法として、初代培養細胞を特殊な培地で培養し sphere を形成する細胞を回収し、その sphere を脳へ移植することで、細胞を分離し、さらに同様の処理を施すという方法も合わせて行う。こちらの方法も現在進行中である。以上のような主に 2 つのアプローチで腫瘍幹細胞を分離する。

②制限増殖型ヘルペスウイルス (rQNestin34.5) の調整

既に開発済みであるが、今後はよりウイルスタイターを上げるために、ウイルス産生細胞の培養条件、ウイルス精製の際のウイルス分離条件等を改良する。

③In vitro でのウイルスの悪性脳腫瘍幹細胞に対する抗腫瘍効果の検討

①の実験で得られた培養腫瘍細胞を用いて抗腫瘍効果を検討する。古典的な WST1 assay を行い、腫瘍細胞生存率を分析するとともに、増殖型ウイルスの細胞内での増殖状況を virus replication assay を行い分析する。FACS を用いたアポトーシス分析も行い、更にはタイムラプス顕微鏡で細胞にウイルスが感染し、細胞が死んでいく状況（実際に増殖型ウイルスの抗腫瘍効果はアポトーシスによるものか、それ以外のものかに着目する）を分析する予定である。

④悪性脳腫瘍幹細胞を用いた動物モデルの作成

マウスの脳に定位的に①の実験で得られた腫瘍を注入する。しかるべき後に脳標本作製し、腫瘍の生着、増殖様式を分析する。この際、腫瘍の浸潤状況については免疫組織学的に特に詳しく分析する予定である。

⑤In vivo 動物モデルを用いたウイルスの抗腫瘍効果の検討

ウイルスの腫瘍内投与での効果判定並びに、浸潤性モデルについてはウイルスの腫瘍内投与における効果の検討を行う予定である。皮下腫瘍モデルを用いた増殖抑制分析を行うことと脳腫瘍モデルでの生存曲線分析を行うことはもちろんのこと、MRI を用いて生存動物内で

の脳腫瘍モデルでも増殖抑制について分析を行う。また、適当な時期に脳腫瘍標本を作製し、更に詳細な分析を行う。

⑥In vivoでのウイルス毒性の検討

マウス正常脳にウイルスを注入し、脳標本を作製しウイルスの毒性について検討する。nestin陽性であるneural stem cellの存在が報告されている脳室周囲について、特に詳しく検討する。

4. 研究成果

①悪性脳腫瘍幹細胞の分離

手術で摘出された悪性脳腫瘍細胞を初代培養し、sphereを形成する細胞を回収し、増殖してきた細胞をAthymic mouseの皮下に注入し腫瘍を形成してくるものを培養した。増殖能力と腫瘍形成能力を持った細胞を分離した。再現性があり、現在脳腫瘍幹細胞と考えられている細胞が樹立できたと考えられた。

②制限増殖型ヘルペスウイルス(rQNestin34.5)の調整

既に関済済みであるが、ウイルスタイトーを挙げるために、ウイルス産生細胞の培養条件、ウイルス精製の際のウイルス分離条件等を改良した。

③In vitroでのウイルスの悪性脳腫瘍幹細胞に対する抗腫瘍効果の検討

①の実験で得られた培養腫瘍細胞を用いて抗腫瘍効果を検討した。WST1 assayを行い、腫瘍細胞生存率を分析し、抗腫瘍効果を認めた。また、増殖型ウイルスの細胞内での増殖状況をvirus replication assayを行い、より有意な増殖の差を得た。

④悪性脳腫瘍幹細胞を用いた動物モデルの作成

マウスの脳に定位的に①の実験で得られた腫瘍を注入した。しかるべき後に脳標本を作製し、腫瘍の生着、増殖様式を分析したが、現在十分な結果が得られていない。今後、細胞数、注入する前の条件、などを変えることにより、生着についての実験を行っていきたい。また、In vivo動物モデルを用いたウイルスの抗腫瘍効果の検討については、脳腫瘍幹細胞モデルの作成後に行う予定である。治療実験は準備段階ではあるが、腫瘍幹細胞に対する治療研究は、脳腫瘍治療の新たな展開に必要な研究であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2件)

①市川智継、神原啓和、黒住和彦、伊達 勲、中枢神経原発リンパ腫、脳神経外科速報 18(9): 1128-1137, 2008、査読有

②神原啓和、市川智継、伊達 勲、脳腫瘍幹細胞 (brain tumor stem cell)、脳神経外科速報、17、832-838、2007、査読有

[学会発表] (計 8件)

①市川智継、神原啓和、伊達 勲、ナビゲーション下に定位的穿刺を可能にするSure Trak専用外筒の作製、第17回脳神経外科手術と機器学会：長崎、2008.4月

②小坂洋志、市川智継、神原啓和、遺伝子導入間葉系幹細胞によるラットグリオーマ治療効果の検討、第25回日本脳腫瘍学会、2007年12月、東京

③井上 智、市川智継、大西 学、悪性グリオーマの浸潤と血管新生に関する免疫組織学的検討1—臨床サンプルでの解析—、第25回日本脳腫瘍学会、2007年12月、東京

④大倉浩子、市川智継、井上 智、悪性グリオーマの浸潤と血管新生に関する免疫組織学的検討2—浸潤性脳腫瘍動物モデル—、第25回日本脳腫瘍学会、2007年12月、東京

⑤丸尾智子、市川智継、神崎浩孝、プロテオミクス解析を用いた悪性グリオーマの浸潤に関わるタンパクの同定、第25回日本脳腫瘍学会、2007年12月、東京

⑥井上 智、市川智継、丸尾智子、悪性グリ

オーマの浸潤と血管新生に関する免疫組織学的検討、第 66 回社団法人日本脳神経外科学会総会、2007 年 10 月、東京

⑦小坂洋志、市川智継、神原啓和、遺伝子 導入間葉系幹細胞によるラットグリオーマ治療効果の検討、第 66 回社団法人日本脳神経外科学会総会、2007 年 10 月、東京

⑧丸尾智子、市川智継、神崎浩孝、悪性グリオーマの浸潤に関わるタンパクのプロテオミクス解析による同定、第 66 回社団法人日本脳神経外科学会総会、2007 年 10 月、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神原 啓和 (KANBARA HIROKAZU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40420484

(2) 研究分担者

小野田 恵介 (ONODA KEISUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20379837

(3) 連携研究者

市川 智継 (ICHIKAWA TOMOTSUGU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10362964

小野 成紀 (ONO SHIGEKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40335625

新郷 哲郎 (SHINGO TETSURO)

独協医科大学・医学部・助教

研究者番号：50379749

伊達 勲 (DATE ISAO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70236785