

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390403

研究課題名（和文） 脳腫瘍に対する血管新生抑制療法の展開：新規治療法と抵抗性の克服

研究課題名（英文） Progress of anti-angiogenic therapy for brain tumors: new modality and resolution of the resistance

研究代表者 高野 晋吾 (TAKANO SHINGO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50292553

研究成果の概要（和文）：

脳腫瘍に対する血管新生抑制療法の抵抗性の克服と、次世代の腫瘍血管内皮細胞を標的とした治療を提案した。

1. 血管新生抑制作用のある抗癌剤の効果：CPT-11 を低用量持続性に投与することにより、通常用量の断続的投与に比べて、体重減少という全身副作用がなく、腫瘍血管新生および低酸素領域の出現を抑制することによりグリオーマの増殖を抑制することができた。

2. 血管新生抑制療法の抵抗性の克服と標的としてのケモカイン:VEGF 中和抗体 (bevacizumab) の治療によるグリオーマの再発モデルを作成した (Brain Tumor Pathol 2010, J Oncology 2010)。抵抗性の標的として CXCR7 に注目し、CXCR7 特異的抑制物質、low molecular weight heparin (LMWH) の効果をグリオーマモデルで明らかにした。

3. 新規血管新生抑制療法の開発：ワクチン

腫瘍内皮細胞ワクチンのグリオーマに対する効果を in vivo で検討した。腫瘍細胞単独ワクチンに比べて腫瘍内皮細胞を併用したワクチンで増殖抑制効果が強くみられた。

研究成果の概要（英文）：

This study was designed to resolve the resistance and find a new generation anti-angiogenic therapy targeting glioblastoma endothelial cells.

1. Solution of anti-angiogenic treatment for glioblastoma: Metronomic treatment using CPT-11 was effective to glioma growth without systemic side effect (J Neuro-oncology, 2010).

2. Glioblastoma recurrence mouse model with continuous VEGF antibody treatment was established (Brain Tumor Pathol 2010, J Oncology 2010). With this model, Specific CXCR7 inhibitor, CCX771 and LMWH, antagonism of SDF-1, inhibited recurrence after VEGF antibody treatment.

3. Vaccination with tumor endothelial cells and tumor cells inhibited glioma growth strongly compared to vaccination with tumor cell alone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科・腫瘍

キーワード：膠芽腫、血管新生、腫瘍内皮細胞、ケモカイン、抵抗性、腫瘍微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍に対する血管新生抑制療法は抵抗性の出現により、効果に限界がみられており、抵抗性の克服と、次世代の腫瘍血管内皮細胞を標的とした治療を提案し検証することが背景である。

### 2. 研究の目的

強力な血管新生因子である VEGF の中和抗体（ベバシズマブ）による膠芽腫に対する血管新生抑制療法の劇的な効果は、次世代のさらに発展した血管新生抑制療法の展開を必要としている。本研究では血管新生抑制療法の抵抗性の克服手段を明らかにし、次世代の血管新生抑制療法として腫瘍血管内皮細胞を標的とした治療を提案することを目的とする。

#### （1）血管新生抑制療法の抵抗性の克服：

VEGF 中和抗体治療後の血管新生抑制療法の抵抗性には、1) 骨髄からの血管内皮前駆細胞 (EPC) の関与、2) 腫瘍の浸潤増強、3) 周皮細胞の制御が重要で、共通の標的としてケモカイン：SDF-1 とその受容体 CXCR4・7 および増殖因子 TGF- $\beta$  に注目する。これらを標的とすることで、血管新生抑制療法の抵抗性を克服し、さらに血管新生抑制を増強し、腫瘍浸潤を抑制することが可能となる。

#### （2）新規血管新生抑制療法の開発：

新規血管新生抑制療法として、膠芽腫由来血管内皮細胞 (Glioblastoma derived endothelial cell: GBMEC) の特性から、1) GBMEC を標的とした治療の開発、2) GBMEC ワクチン療法の開発、3) GBMEC 中で腫瘍血管内皮幹細胞の同定を行うことにより、次世代の標的とすることを旨とする。

#### （3）膠芽腫腫瘍血管に特異的な胚発生時の

**血管内皮特異的遺伝子群の応用:** VEGF 受容体ノックアウトマウス（胎生致死）を用いてマウス胚発生時の血管内皮細胞に豊富に発現しているが、成体では消失する遺伝子を同定する。発生段階の血管新生で用いられる遺伝子プログラムは、腫瘍血管新生過程でも繰り返し使用されるため、これらの遺伝子の発現が膠芽腫でもみられると予想される。これら新規遺伝子群のヒト神経膠腫中の培養血管内皮細胞 (GBMEC) における発現を real time RT-PCR で検討する。さらに、腫瘍組織の in situ hybridization でその局在を確認する。

### 3. 研究の方法

#### （1）血管新生抑制療法の抵抗性の克服：

①膠芽腫再発モデル: ヒト膠芽腫細胞のマウス皮下腫瘍および脳腫瘍モデルで、ベバシズマブによる血管新生抑制療法の治療終了後の再発腫瘍モデルを作成する。ヒト悪性グリオーマ細胞、U87 に GFP を transfection した U87-GFP 細胞を SCID マウス脳内に移植すると、3-4 週間で脳内にグリオーマを形成してくる。そこで、脳内に細胞移植後、VEGF 中和抗体の単独治療 (50  $\mu$ g/週) を 8 週間行い、膠芽腫再発モデルを作成する。抵抗性 (EPC の取り込み、浸潤能亢進、周皮細胞の制御) が亢進しているかどうか、ケモカイン：SDF-1, CXCR4, CXCR7 の発現の変化を明らかにする。

②EPC の腫瘍血管への取り込み：GFP でラベルされた EPC を尾静脈から投与し 1 週間後の腫瘍組織の蛍光顕微鏡観察で、EPC の取り込み程度を全内皮細胞中での割合で定量する。

③浸潤能の亢進の程度：①HE 染色での周

脳組織への浸潤の程度、②凍結切片での film in situ zymography による gelatinase 活性の局在の同定)、③凍結組織の腫瘍ホモジネートでの gelatin zymogram による gelatinase 活性の定量、④パラフィン切片での MMP2, MMP9 の免疫染色による蛋白発現を測定する。

⑤周皮細胞の制御: 周皮細胞のマーカーとして desmin,  $\alpha$ -SMA, RGS-5 (regulator of G protein signaling 5)、NG2 (Neuron-gial 2)、PDGFR  $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor beta) を用い<sup>2)</sup>、脳腫瘍組織での周皮細胞と内皮細胞 (CD34 染色) の局在関係を二重蛍光染色で確かめて、周皮細胞でカバーされる血管の数を定量する。

⑥膠芽腫再発モデルを使った抵抗性の克服: 前年度の実績から抵抗性に関わる標的分子として SDF-1, CXCR7 に注目し、その抑制効果が in vitro でみられる low molecular weight heparin (Dalteparin) および CXCR7 特異的抑制剤: CCX771 (ChemoCentrix Inc, CA から供与) の効果を膠芽腫再発モデルで評価する。VEGF 経路をとらないマクロファージのグリオーマ血管新生への関与から、M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) 抑制剤: Ki20227, anti-c-fms antibody, imatinib の併用により抵抗性を克服できるかどうかを検証する。さらに、SDF-1 の抑制作用があり、深部静脈血栓予防効果がある低分子ヘパリンと VEGF 中和抗体との併用療法の in vitro, in vivo の実験結果に基づき、臨床試験 (phase I, II) を多施設協同研究で企画する。

**(2) 膠芽腫腫瘍血管内皮細胞ワクチンの基礎実験:** GBMEC から内皮細胞ワクチンを作成し、マウス脳腫瘍モデルでその効果を

評価する。

腫瘍血管内皮細胞ワクチンの応用: グリオーマ組織からの腫瘍内皮細胞に SV40 抗原を導入し不死化腫瘍内皮細胞を作成する。ソフトアガー上で腫瘍造成がないことを確認して、腫瘍内皮細胞ワクチンとしての効果をマウス in vivo 脳内モデルで評価する。

**(3) 膠芽腫腫瘍血管に特異的な胚発生時の血管内皮特異的遺伝子群の応用:** VEGF 受容体ノックアウトマウス (胎生致死) を用いてマウス胚発生時の血管内皮細胞に豊富に発現しているが、成体では消失する遺伝子を同定する。発生段階の血管新生で用いられる遺伝子プログラムは、腫瘍血管新生過程でも繰り返し使用されるため、これらの遺伝子の発現が膠芽腫でもみられると予想される。これら新規遺伝子群のヒト神経膠腫中の培養血管内皮細胞 (GBMEC) における発現を real time RT-PCR で検討する。さらに、腫瘍組織の in situ hybridization でその局在を確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血管新生抑制療法の抵抗性の克服

①血管新生抑制作用のある抗癌剤、CPT-11 を低用量持続性に投与することによるグリオーマの増殖抑制効果を in vivo で検討した。通常用量の間歇的投与に比べて、体重減少という全身副作用がなく、腫瘍血管新生および低酸素領域の出現を抑制することによりグリオーマの増殖を抑制することができた。このような低用量持続投与 (metronomic treatment) は血管新生抑制療法の抵抗性の克服に大切な手法であり、結果は学術誌「J Neurooncol」に掲載された。

②抵抗性の標的としてケモカイン: SDF-1 とその受容体 CXCR7 の重要性をグリオーマ組織での発現から評価し、結果の一部は学術誌「J Oncology」に掲載された。

③グリオーマ再発モデルの確立と抵抗性の標的としてケモカイン：VEGF 中和抗体 (bevacizumab) の治療によるグリオーマの再発モデルを作成した。SCID マウスの脳内にヒトグリオーマ細胞を移植し、bevacizumab の投与を 8 週間連続すると脳内腫瘍は MMP9, SDF1 の発現上昇とともに周囲への浸潤性を増すことを報告した (Brain Tumor Pathol 2010, J Oncology 2010)。

ヒト再発膠芽腫 7 例に対して Bevacizumab の治療効果および再発様式を MRI 画像による腫瘍の大きさだけでなく、腫瘍血流量をあらわす rCBV と腫瘍密度を表す ADC 値で明らかにし、脳神経外科学会総会シンポジウムで報告した。

抵抗性の標的として CXCR7 に注目し、CXCR7 特異的抑制物質、CCX771 (Chemocentrix 社) の効果を *in vitro*、*in vivo* グリオーマモデルで明らかにした。また、CXCR7 のリガンドである SDF-1 の抑制作用のある low molecular weight heparin (LMWH) の効果を *in vitro*、*in vivo* グリオーマモデルで明らかにした。

#### (2) 腫瘍内皮細胞ワクチン療法の開発：

腫瘍内皮細胞ワクチンのグリオーマに対する効果を *in vivo* で検討した。腫瘍細胞単独ワクチンに比べて腫瘍内皮細胞を併用したワクチンで増殖抑制効果が強くみられた。結果は「がん治療のあゆみ」に掲載された。腫瘍内皮細胞を単独でワクチンとして十分量準備することが困難であった。腫瘍内皮細胞の不死化、細胞株となった内皮細胞を用いるなどの工夫が必要であることが明らかとなった。

#### (3) 膠芽腫血管内皮細胞に特異的な遺伝子の同定：

ヒト膠芽腫組織より分離培養した膠芽腫内皮細胞と正常血管内皮細胞の遺伝子の違いをマイクロアレイで調べ、膠芽腫内

皮細胞に特に高発現する遺伝子として① jagged 1, ② PLXDC1 を、胎生期に見られる VEGFR ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスでの遺伝子の違いをマイクロアレイで調べてノックアウトマウスで特に高発現する遺伝子として③ PLVAP, ④ GPCR GPR116 を同定した。これら①～④に対する抗体により膠芽腫組織の腫瘍血管が特異的に染色されたことよりこれらは膠芽腫の特異的な血管新生因子と考えられ報告した (Blood, 2012)。

(4) 今後の方針：これまでの研究で、新規治療として標的である jagged1 という分子を同定し、治療実験まで行うことができた。しかし、SDF-1 の抑制作用があり、深部静脈血栓予防効果がある低分子ヘパリンと VEGF 中和抗体との併用療法の *in vitro*、*in vivo* の実験結果に基づき、臨床試験 (phase I, II) を多施設協同研究で企画する計画は時間的に行えなかった。また、VEGF 経路をとらないマクロファージのグリオーマ血管新生への関与から、M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) 抑制剤：Ki20227, anti-c-fms antibody, imatinib の併用による、マクロファージの関与に関する抵抗性の実験にも時間的に行えなかった。

膠芽腫血管の新しい標的分子、jagged1 に対して、光線力学療法および合成ペプチド療法にも展開を検討中である。

また、マクロファージだけでなく、周皮細胞、繊維芽細胞、腫瘍ニッチも含めた腫瘍微小環境を構成する細胞を標的とした血管新生抑制を考えることで、現存の VEGF 療法の抵抗性の克服とさらに強力な血管新生抑制療法を開発する予定である。

膠芽腫血管新生を標的とした光線力学療法 (PDT) の準備を行った。腫瘍血管に特異的に発現する tissue factor を標的とした fVII-conjugated SnCe6 を乳癌に対する PDT

で用いている Dr. Hu (Yale University, Br J Cancer 2011) との膠芽腫モデルでの共同研究を開始した。U87 グリオーマ細胞を脳に移植するマウスクラニアルウィンドウモデルで 635nm のレーザーを照射し、血管新生抑制効果を検討中である。さらに膠芽腫血管への特異性を持たせた target PDT (t-PDT) を行なうために、膠芽腫内皮細胞の検索から判明した jagged-1 を verteporfin に接合し、in vitro および in vivo でグリオーマに対する target PDT の効果を検証するための準備を行った。

#### 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 11 件) 全て査読有

1. Takase H, Takano S, Ema M et al.: Endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo. Blood 2012, Apr 25, P MID 22535667.
2. 高野晋吾: 膠芽腫に対する血管新生抑制療法のトピックス. 総説. NO Shinkei Geka 40: 481-502, 2012.
3. Takano S: Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solution and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation. Brain Tumor Pathol 29: 73-86, 2012.
4. Sakamoto N, Uemae Y, Ishikawa E, Takano S, Nakai K, Yamamoto T, Zaboronok A, Matsumura A: Glioma immunotherapy with combined autologous tumor cell and endothelial vaccination in vivo. Neurol Med Chir (Tokyo) 52: 194-201, 2012.
5. Osuka S, Takano S, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A: Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. Neurol Med Chir (Tokyo) 52: 186-19

3, 2012.

6. Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, Matsuda M, Nakai K, Yanagiya R, Morita S, Tsuboi K, Matsumura A: Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53 and internexin as a prognostic marker of glial tumors. J Neurooncol in press (2012) DOI 22396072.
7. Sakamoto N, Ishikawa E, Yamamoto T, Satomi K, Nakai K, Sato M, Enomoto T, Morishita Y, Takano S, Ohno T, Tsuboi K, Matsumura A: Pathological changes after autologous formalin-fixed tumor vaccine therapy combined with temozolomide for glioblastoma – three case reports- Neurol Med Chir (Tokyo) 51: 319-325, 2011.
8. Takano S, Yamashita T, Ohneda O: Molecular targets for glioma angiogenesis. J Oncol 2010. 2010-351908 Epub 2010, Apr 18, PMID 20414463
9. Takano S, Kamiyama H, Mashiko R, Osuka S, Ishikawa E, Matsumura A: Metronomic treatment of malignant glioma xenografts with irinotecan (CPT-11) inhibits angiogenesis and tumor growth. J Neurooncol 99: 177-185, 2010.
10. Takano S, Mashiko R, Osuka S, Ishikawa E, Ohneda O, Matsumura A: Detection of failure of bevacizumab treatment for malignant glioma based on urinary matrix metalloproteinase activity. Brain Tumor Pathol 27: 89-94, 2010.

[学会発表] (計 11 件)

1. 高野晋吾. 悪性脳腫瘍に対する血管新生抑制療法. 第 31 回日本脳腫瘍コングレス総会 (ランチョンセミナー), 2011 年

- 5月8日, パシフィコ横浜.
2. 高野晋吾. グリオーマに關与する内皮細胞: 血管内皮前駆細胞と腫瘍血管内皮細胞. 第6回脳腫瘍の基礎シンポジウム(招待講演), 2011年1月29日, 東京.
  3. 高野晋吾. グリオーマにおける血管新生抑制療法の効果と耐性. 千葉がんシンポジウム(招待講演), 2011年1月15日, 幕張.
  4. 高野晋吾ら. 血管新生抑制療法の標的となる膠芽腫血管内皮細胞に特異的血管新生因子. 第28回脳腫瘍学会, 2010年11月28日, 軽井沢.
  5. 高野晋吾ら. 悪性神経膠腫に対する血管新生抑制療法の抵抗性の克服. 第69回日本神経外科学会総会, 2010年10月27日, 福岡.
  6. Takano S et al. CXCR7 specific inhibitor inhibits glioblastoma angiogenesis and growth in vitro and in vivo. 第69回日本癌学会, 2010年10月22日, 大阪.
  7. Takano S et al. SDF-1 and CXCR7 are key molecules for glioma angiogenesis and invasiveness. 18<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, 2010年5月18日, Germany.
  8. 高野晋吾, 石川栄一 他. グリオーマに対する VEGF 中和抗体の作用機序: 血管新生抑制と腫瘍細胞のアポトーシス増強. 第27回日本脳腫瘍学会, 2009年11月8日, 大阪.
  9. 高野晋吾, 大根田修 他. グリオーマ血管新生の分子標的療法. 第68回日本脳神経外科学会総会(シンポジウム) 2009年10月14日, 東京
  10. Takano S, Ema M, Ishikawa E, Ohneda O et al. SDF-1 and CXCR7 are key molecules for glioma angiogenesis and invasiveness.

第68回日本癌学会. 2009年10月1日, 横浜.

11. Takano S, Ema M, Ohneda O, Ishikawa E et al. The role of chemokine SDF-1/CXCR4/CXCR7 for glioblastoma angiogenesis and glioblastoma derived endothelial cells. The 3<sup>rd</sup> Quadrennial Meeting of the WFNO 2009年5月11, 横浜

[図書] (計1件)

1. 松村 明, 高野晋吾: 傍矢状洞髄膜腫. イラストレイテッド脳腫瘍外科学、河本圭司、本郷一博、栗栖 薫 編集、医学書院、128-131, 2011.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 高野 晋吾 (TAKANO SHINGO)  
筑波大学・医学医療系・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・医学医療系・教授  
研究者番号: 30311872

依馬 正次 (EMA MASATSUGU)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 60359578

石川 栄一 (ISHIKAWA EIICHI)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 22791332

久保田 義顕 (KUBOTA YOSHIAKI)  
慶應義塾大学・総合医科学研究センター・特任講師  
研究者番号: 50348687