

## 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 05 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591870

研究課題名（和文）悪性神経膠腫における新規癌幹細胞マーカー同定と分子標的治療への試み  
研究課題名（英文）

Identification of novel brain tumor stem cell markers and development of molecular targeting therapies for malignant gliomas

研究代表者

香川 尚己（KAGAWA NAOKI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50444542

研究成果の概要（和文）：

悪性神経膠腫において腫瘍幹細胞に特異的な新規細胞表面マーカーCD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule(ALCAM)を同定することで腫瘍幹細胞を純化および濃縮する技術を確立した。さらに、細胞生物学的な解析を行い、この分子の悪性神経膠腫における機能的役割について解析したところ、ALCAM は悪性神経膠腫において腫瘍浸潤や腫瘍血管新生などの治療抵抗性獲得に関係し、予後不良因子として働いている可能性が示唆された。特に soluble ALCAM を治療標的とする可能性が検討されるべきであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we showed that CD166/activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) was highly expressed on glioblastoma progenitor cells. ALCAM<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> cells were highly enriched with tumor-sphere-initiating cells *in vitro*. The investigation about the *in vitro* and *in vivo* function of ALCAM in glioblastoma cells demonstrated ALCAM and its soluble isoform may be involved in invasion, progression and angiogenesis in glioblastomas and can result in poor prognosis or resistance against chemo-radiotherapies. Development of molecular targeting therapy against soluble ALCAM should be planned in the future.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・脳神経科学

キーワード:(1) 腫瘍幹細胞(2) 悪性脳腫瘍(3) 分子標的薬剤 (4) 腫瘍発生(5) 治療耐性

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫に対して、現在まで様々な手術法、抗癌剤や放射線治療の試みが行われたが、現在標準的な治療とされる摘出術後のテモ

ゾロミドと放射線治療の組み合わせでも 5 年生存率の著明な改善は得られていないのが現状である。また、近年、悪性脳腫瘍内に神経幹細胞と同様の自己複製能、多分化能、腫瘍形成

能の性質を有する腫瘍幹細胞の存在が明らかとなり、既存の放射線療法、抗癌剤治療に対して、高度に耐性であることが報告されている。この腫瘍幹細胞を排除するためには新たな治療戦略が必要である。

一般的に、腫瘍幹細胞において CD133 陽性分画に腫瘍幹細胞が存在することが知られているが、近年の報告では、CD133 陽性分画だけでなく CD133 陰性細胞の中にも sphere 形成能や多分化能、自己複製能を有する細胞群が存在していることが分かってきている。幹細胞研究が進歩するにつれ、脳腫瘍および脳腫瘍細胞株より少数の腫瘍幹細胞を分離する技術が開発されてきているが、腫瘍の発生過程を理解し、脳腫瘍治療の重要な標的として効果的な治療法を開発していくためには、腫瘍幹細胞により特異的な新規抗原マーカーの同定は必要不可欠なものであると言える。

また、悪性神経膠腫における新規癌幹細胞マーカーに関わる分子を調査し機能的役割を再検討することにより、悪性神経膠腫の悪性度や治療抵抗性のメカニズムを明らかにし、更にこれらの分子を標的とした新しい治療薬の開発が可能となりうると考える。

このように、腫瘍幹細胞の研究は、治療応用のみならず横断的な悪性神経膠腫の診断と新しい分類への試みを切り開く可能性を秘めていると考えて、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究は、悪性神経膠腫において腫瘍幹細胞に特異的な新規細胞表面マーカーを同定することで神経幹細胞を純化および濃縮する技術を確立する。さらに、腫瘍幹細胞の細胞生物学的な解析によって、腫瘍発生や耐性能のメカニズムを解明する。また、新たな分子標的治療薬剤の可能性について検討を行った。

## 3. 研究の方法

## 高純度腫瘍幹細胞分画の分離・培養法の確立と新規表面抗原の同定

悪性神経膠腫手術例から採取した腫瘍細胞を flow cytometry(FACS)にて CD133 陽性群と陰性群に分離し、signal sequence trap 法や採取した mRNA を使用し microarray 法を用いて CD133 陽性群に高発現する分子の同定を試み、候補遺伝子を選択した (Fig1)。また、候補となった分子を基に FACS を用いて、それぞれ陽性群と陰性群に分け、sphere 形成能を確認した。Sphere 形成能が高いものを選択した。

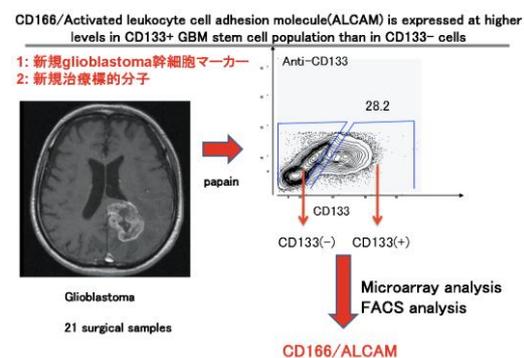


Fig1

## 悪性神経膠腫における新規腫瘍幹細胞マーカーの機能的役割

U87MG 及び U251 を用い ALCAM knock down 細胞株及びその isoform である soluble ALCAM の強制発現株を作成した。これらを用い in vitro での浸潤、増殖能の検討、免疫不全 new-born マウスへの投与を行った。

## 臨床検体での新規腫瘍幹細胞の発現と臨床成績との相関

当院で治療を行った悪性神経膠腫患者 (IDH1 変異のある grade2 から 4 までの神経膠腫 35 例、②、IDH1 変異のない glioblastoma (GBM) 連続 39 症例、年齢: 14 -83 歳、平均 59 歳、男性 24 名、女性 15 名) より得られた組織標本を基に新規癌幹細胞マーカーの発現と臨床成績 (overall survival, progression free survival, MRI

に基づく腫瘍発生母地、初回再発 pattern)との  
 相関について統計学的手法を用いて検討を行  
 なった。

#### 4. 研究成果

##### 高純度腫瘍幹細胞分画の分離・培養法の確立 と新規表面抗原の同定

悪性神経膠腫から採取した腫瘍細胞を  
 flow-cytometry にて CD133 陽性群と陰性群に  
 分離し、microarray 法を用いて解析したところ、  
 CD166/Activated leukocyte cell adhesion  
 molecule(ALCAM)という分子を同定した。  
 ALCAM は CD133 陽性細胞群に比較的特異的  
 に発現していた (Fig2)。ALCAM 陽性細胞は  
 sphere 形成能が高く、ALCAM は腫瘍幹細胞成  
 分をより濃縮することが確認された (Fig3)。

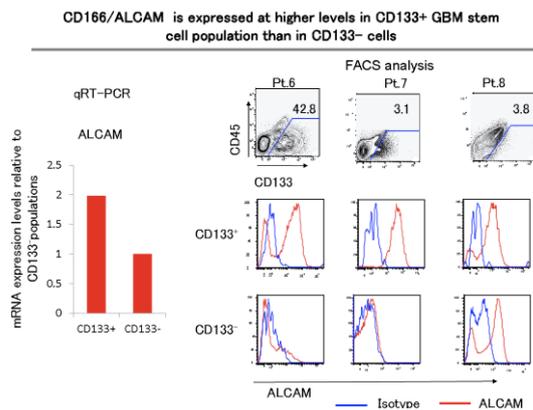


Fig2

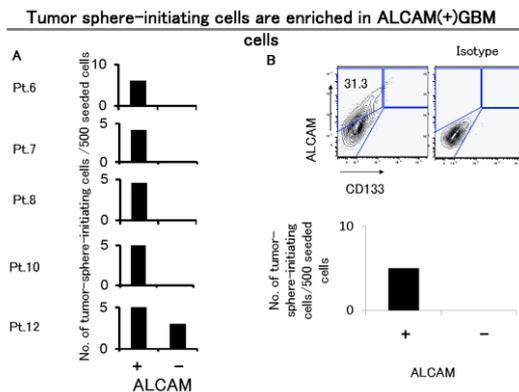


Fig3

##### 悪性神経膠腫における新規腫瘍幹細胞マーカー

##### 一の機能的役割

U87MG ALCAM knock down 株では、コント  
 ロール群と比して浸潤が促進され、その一方で  
 腫瘍血管新生については抑制されていた。同様  
 に、Soluble ALCAM 強制発現株でも、浸潤が促  
 進された (Fig4)。一方、soluble ALCAM 強制発  
 現株を移植したマウスモデルでは、コントロール  
 群と比して著明な腫瘍形成が確認された  
 (Fig5)。

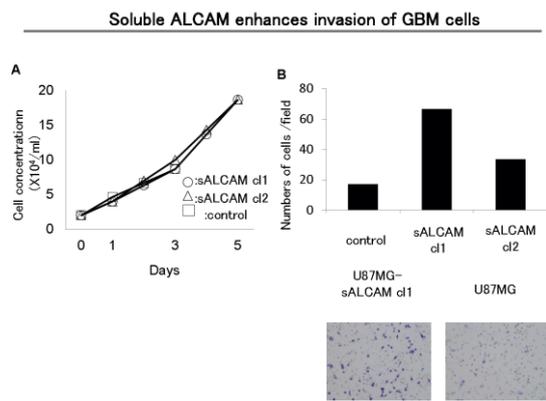


Fig4

##### Intracranial transplantation

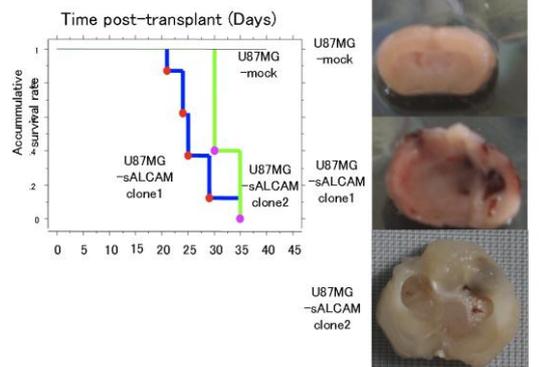


Fig5

##### 臨床検体での新規腫瘍幹細胞の発現と臨床成 績との相関

IDH1 変異のある grade2、3、4 の glioma におけ  
 る ALCAM 発現細胞の割合を数えたところ、  
 ALCAM 陽性率は WHO grading と正の相関を示  
 した (Fig6)。IDH1 変異のない GBM で ALCAM  
 陽性細胞に関して、60%以上の群と 60%未満の  
 群で無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間

(OS)の比較すると、ALCAM 高発現群の方が予後不良であった(Fig7)。

初発時のMRI 所見で腫瘍の発生部位を分類すると、脳室近傍に発生した腫瘍は ALCAM を高発現していた。再発のパターンを比較すると、瀰漫性に浸潤、遠隔に再発する腫瘍では、同じく ALCAM を高発現していた。

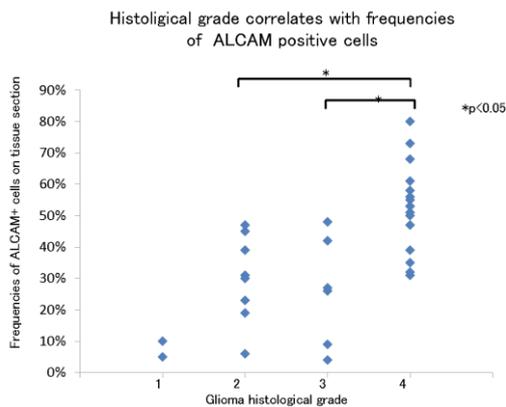


Fig6

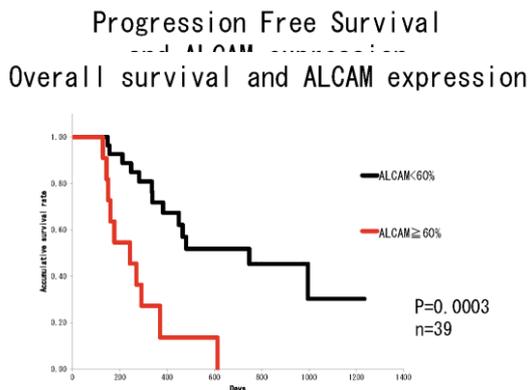


Fig7

## 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 21 件)

- ① Hosen N(1 番目) et al(20 名): CD48 as a novel molecular target for antibody therapy in multiple myeloma. *Leukemia* 156(2): 213-224, 2012. 査読有
- ② Nakajima H, Hosen N(4 番目) et al(16 名): Enhanced tumor immunity of WT1 peptide vaccination by interferon- $\beta$  administration. *Vaccine* 30(4): 722-729, 2012. 査読有

- ③ Shirakata T, Hosen N(4 番目) et al(11 名): WT1 Peptide Therapy for a Patient with Chemotherapy-resistant Salivary Gland Cancer. *Anticancer Res* 32(3): 1081-1085, 2012. 査読有
- ④ Kijima N, Hosen N(2 番目), Kagawa N(3 番目), Hashimoto N(4 番目), Yoshimine T(9 番目) et al: CD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule is expressed on glioblastoma progenitor cells and involved in the regulation of tumor cell invasion. *Neuro-Oncology* 2011 (in press) 査読有
- ⑤ Chiba Y, Kinoshita M(2 番目), Kagawa N(6 番目), Hashimoto N(2 番目), Hosen N(14 番目), Yoshimine T(15 番目) et al(15 名): Use of (11)C-methionine PET parametric response map for monitoring WT1 immunotherapy response in recurrent malignant glioma. *Journal of Neurosurgery* 2011 (in press) 査読有
- ⑥ Hashimoto N(1 番目), Kinoshita M(4 番目), Kagawa N(5 番目), Yoshimine T et al(11 名): Slower growth of skull base meningiomas compared with non-skull base meningiomas based on volumetric and biological studies. *Journal of Neurosurgery* 2011 (in press) 査読有
- ⑦ Tuboi A, Hosen N(11 番目) et al(13 名): Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Leukemia* 2011 (in press) 査読有
- ⑧ Morimoto S, Hosen N(7 番目), Kagawa N(16 番目), Hashimoto N(17 番目), Yoshimine T(18 番目) et al(21 名): Biased usage of T cell receptor  $\beta$ -chain variable region genes of Wilms' tumor gene (WT1)-specific CD8(+) T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Science* 2011 (in press) 査読有
- ⑨ Arita H, Kinoshita M, Kagawa N, Hashimoto N, Yoshimine T et al: (11) C-methionine uptake and intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence as separate index markers of cell density in glioma: A stereotactic image-histological analysis. *Cancer* 2011 (in press) 査読有
- ⑩ Arita H, Kinoshita M(2 番目), Kagawa N(8 番目), Hashimoto N(13 番目), Yoshimine T(14 番目) et al(14 名): Clinical characteristics of meningiomas assessed by (11)C-methionine and (18)F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography. *J Neurooncol.* 2011 (in press) 査読有

- ⑪ Fujimoto Y, Hashimoto N (2 番目), Kinoshita M (3 番目), Kagawa N (8 番目), Yoshimine T (9 番目) et al (9 名): Hepatitis B virus reactivation associated with temozolomide for malignant glioma: a case report and recommendation for prophylaxis. *International Journal of Clinical Oncology* 2011 (in press) 査読有
- ⑫ Kinoshita M, Kagawa N, Hashimoto N, Yoshimine T et al: Imaging <sup>18</sup>F-fluorodeoxy glucose/<sup>11</sup>C-methionine uptake decoupling for identification of tumor cell infiltration in peritumoral brain edema. *Journal of Neurooncology* 106 (2): 417-425, 2011. 査読有
- ⑬ Hashii Y, Hosen N (7 番目) et al (12 名): WT1 peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric leukemic patients with high risk for relapse: successful maintenance of durable remission. *Leukemia* 26(3): 530-532, 2011. 査読有
- ⑭ Morimoto M, Kagawa N (8 番目), Kinoshita M (9 番目), Hashimoto N (10 番目), Yoshimine T (11 番目) et al (12 名): Significance of tumor volume related to peritumoral edema in intracranial meningioma treated with extreme hypofractionated stereotactic radiation therapy in three to five fractions. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 41(5): 609-619, 2011. 査読有
- ⑮ Yamamoto F, Hashimoto N (2 番目), Kagawa N (3 番目), Yoshimine T (11 番目) et al (11 名): A survey of disclosure of diagnosis to patients with glioma in Japan. *International Journal of Clinical Oncology* 16(3): 230-237, 2011. 査読有
- ⑯ Rabo CS, Hashimoto N (2 番目), Kagawa N (3 番目), Kinoshita M (7 番目), Yoshimine T (8 番目) et al (8 名): A rare case of a simultaneously detected suprasellar and intramedullary spinal cord germinoma. *Brain Tumor Pathol* 27(2): 117-20, 2011. 査読有
- ⑰ Kinoshita M (1 番目), Hashimoto N (2 番目), Kagawa N (5 番目), Yoshimine T (9 番目) et al (9 名): Immunohistological profiling by B-cell differentiation status of primary central nervous system lymphoma treated by high-dose methotrexate chemotherapy. *J Neuro-oncol* 99(1): 95-101, 2011. 査読有
- ⑱ Okita Y, Kinoshita M (2 番目), Kagawa N (4 番目), Hashimoto N (8 番目), Yoshimine (9 番目) et al (9 名): (<sup>11</sup>C)-methionine uptake correlates with tumor cell density rather than with microvessel density in glioma. *Neuroimage* 49(4): 2977-2982, 2010. 査読有
- ⑲ Kinoshita M (1 番目), Kagawa N (4 番目), Hashimoto N (6 番目), Yoshimine T (7 番目) et al (7 名). Diffusion tensor based tumor infiltration index cannot discriminate vasogenic edema from tumor-infiltrated edema. *J Neurooncol* 96: 409-415. 2010 Epub 2009 Aug 21. 査読有
- ⑳ Chiba Y, Hashimoto N (2 番目), Kinoshita M (6 番目), Kagawa N (7 番目), Hosen N (9 番目), Yoshimine T (12 番目) et al (12 名): Effects of concomitant temozolomide and radiation therapies on WT1-specific T cells in malignant glioma. *JPN J Clin Oncol*: 40(5): 395-408, 2010. 査読有
- ㉑ Chiba Y, Hashimoto N (2 番目), Kinoshita M (6 番目), Kagawa N (7 番目), Yoshimine T (10 番目) et al (10 名): Prognostic value of WT1 protein expression level and MIB-1 staining index as predictor of response to WT1 immunotherapy in glioblastoma patients. *Brain Tumor Pathol* 27(1), 29-34. 2010. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 香川尚己、遺伝子発現プロファイリングに基づく髄芽腫のサブタイプ分類の可能性、第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会、2011 年 11 月 28 日、岐阜
- ② 香川尚己、悪性神経膠腫における Activated leukocyte cell adhesion molecule と予後との関連性、第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、岐阜
- ③ 香川尚己、小児髄芽腫における放射線減量集学的治療の長期治療成績と機能的予後を考慮した今後の方向性、第 70 回日本神経外科学会総会、2011 年 10 月 12 日、神奈川
- ④ 香川尚己、自然縮小を来した intracranial germinoma の 3 症例、第 10 回小児脳腫瘍治療研究会、2011 年 7 月 16 日、大阪
- ⑤ 香川尚己、頭蓋内胚細胞腫に対する内視鏡的腫瘍生検術の役割、第 17 回日本神経内視鏡学会、2010 年 12 月 10 日、千葉
- ⑥ 香川尚己、当院における頭蓋内胚細胞腫の診断と治療成績、第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会、2010 年 11 月 29 日、長野
- ⑦ 香川尚己、鎖肛および後彎変形を合併した巨大な脊髄髄膜瘤に対する治療経験、第 27 回日本二分脊椎研究会、2010 年 7 月 24 日、大阪
- ⑧ Naoki Kagawa、Analysis of diagnostic surgical strategies for intracranial germinomas, 14th International Symposium

on Pediatric Neuro-Oncology, June 22 , 2010. Vienna (Austria)

- ⑨ 香川尚己、再発髄芽腫に対する集学的治療、第 38 回日本小児神経外科学会、2010 年 6 月 5 日、富山
- ⑩ 香川尚己、当院での新生児期・乳児期水頭症治療に対する課題と対策、第 38 回日本小児神経外科学会、2010 年 6 月 4 日、富山
- ⑪ 香川尚己、内視鏡支援による脳室腹腔短絡術およびシヤント修復術の治療成績、第 16 回日本神経内視鏡学会、2009 年 12 月 5 日、富山
- ⑫ 香川尚己、転移性脳腫瘍における外科的治療およびサイバーナイフの役割と長期治療成績、第 68 回日本脳神経外科学会総会、2009 年 10 月 14 日、東京
- ⑬ 香川尚己、内視鏡支援下脳室腹腔短絡術の有用性と問題点、第 37 回日本小児神経外科学会、2009 年 6 月 11 日、大阪
- ⑭ Naoki Kagawa、 Effectiveness of multi-staged operations with combined chemotherapies for huge malignant infantile brain tumors in the first year of life. The 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology jointly with The 6th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology. May 12, 2009. Yokohama, Japan
- ⑮ 香川尚己、脊髄と鞍上部に同時発生した germinoma の一例、第 27 回日本脳腫瘍病理学会、2009 年 5 月 8 日、福岡

[図書] (計 3 件)

- ① 香川尚己、メディカ出版、術前術後の看護・治療の流れがひと目でわかる脳神経外科疾患別看護マニュアル、(2012)、288
- ② 香川尚己、株式会社技術情報協会、有効性・副作用・予後の評価指標となるがんの新しいバイオマーカー/予測因子による個別化医療時代に求められる抗がん剤開発、(2011)、365
- ③ 橋本直哉、医学書院、イラストレイテッド 脳腫瘍外科学、(2011)、260

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

①

名称: 脳腫瘍幹細胞の検出方法  
発明者: 保仙直毅、杉山治夫、香川尚己、吉峰俊樹  
権利者: 同上  
種類: 特願  
番号: 2011-131050  
出願年月日: 2011/6/13  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.nsurg.med.osaka-u.ac.jp/school/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香川 尚己 (KAGAWA NAOKI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 50444542

(2) 研究分担者

保仙 直毅 (HOSEN NAOKI)  
大阪大学・医学系研究科・准助教  
研究者番号: 10456923

橋本 直哉 (HASHIMOTO NAOYA)  
大阪大学・医学系研究科・准助教  
研究者番号: 90315945

吉峰 俊樹 (YOSHIMINE TOSHIKI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 00201046

(3) 連携研究者

木下 学 (KINOSHITA MANABU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 40448064  
(2009 年)