

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791367

研究課題名 (和文) 間葉系幹細胞が脳腫瘍病態生理に及ぼす影響の検討

研究課題名 (英文) Effects of mesenchymal stem cell on microenvironment of brain tumor

研究代表者

中溝 玲 (ナカミゾ アキラ)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80529800

研究成果の概要 (和文)：

ヒト間葉系幹細胞の存在が、ヒト脳腫瘍細胞の増殖を加速することを証明した。また、間葉系幹細胞から分泌された各種 cytokine、chemokine、growth factor を測定することにより、間葉系幹細胞から分泌され脳腫瘍細胞の挙動を制御している液性因子を同定した。グリオーマ細胞からの MMP2 と MMP3 の分泌が、間葉系幹細胞によって抑制されていることが確認された。

研究成果の概要 (英文)：

We proved that human mesenchymal stem cells accelerate the growth of human glioma cells (U87 cells) by cell-cell contact or unverified liquid factor. The level of VEGF, bFGF, TGF β 1, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP13, MMP1, IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-13, CCL3, CCL-4, CCL-5 in the supernatant obtained from the co-culture system were measured ELISA assay. We proved that the secretion of MMP2 and MMP3 from human glioma cells are inhibited by the presence of human mesenchymal stem cells in a dose-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳腫瘍学

キーワード：間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 組織幹細胞の中で、間葉系幹細胞は最も臨床応用が進んでいる幹細胞であるが、その本態の解明は未だ不完全である。間葉系幹細胞は骨髄中に存在し、損傷を受けた組織に集簇し修復・再生する際の細胞の供給源になっていると考えられており、その多様な分

化能から細胞治療を実現する為の tool として期待されている。間葉系幹細胞は骨髄液から分離精製し実験室内で培養増殖させるテクニックが既に確立しており、神経幹細胞や胚性幹細胞のように倫理的な問題が生じることがなく、また自己細胞を用いるため免疫学的問題を回避することができるので、臨床

応用に適している。

近年我々はこの、骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた新しい脳腫瘍治療法を Texas 大学 M. D. Anderson Cancer Center との共同研究により開発し、その有効性を報告した (Nakamizo A, Cancer Res 2005)。ヌードマウスの脳内に glioblastoma 細胞を移植して作成したマウス脳腫瘍モデルにおいて、対側脳あるいは内頸動脈内に投与された間葉系幹細胞は、脳腫瘍に限局して集簇し、かつ、脳腫瘍内に生着して増殖した。さらに、アデノウイルスを用いて β IFN 遺伝子を導入した間葉系幹細胞をマウス脳腫瘍モデルの内頸動脈内に投与すると、脳腫瘍内に限局した間葉系幹細胞から持続的に高濃度の IFN が分泌され、有意に生存期間を延長することに成功し、間葉系幹細胞が有効な delivery system として利用できる可能性を示唆した。

この研究において我々は、間葉系幹細胞の脳腫瘍治療効果に焦点を当てて検討したが、実は、臨床応用に向けて障壁となる可能性のある現象が確認されている。コントロールとして作成した IFN 非産生性間葉系幹細胞を投与された脳腫瘍モデルマウスは、IFN 産生性間葉系幹細胞を投与されたマウスはもちろんであるが、他のコントロールモデルである線維芽細胞や PBS solution を投与されたマウスより有意に生存期間が短縮していた。当時我々は、この現象の機序に関する検討を行わなかった。表皮幹細胞を用いた同様の実験系ではこの現象は観察されておらず、組織幹細胞の種類によっても差がある可能性がある。

(2) 幹細胞の機能の維持は隣接する細胞との相互作用に依存していることが明らかになっている。この幹細胞制御にかかわる微小環境は「ニッチ」と呼ばれ、幹細胞はニッチ細胞が産生する cytokine や細胞外マトリ

ックスなどのニッチ因子のシグナルを受け、幹細胞としての特性を維持していると考えられている (Arai et al. NY Acad Sci 2007)。幹細胞移植治療は、幹細胞をこれらのニッチ環境から隔離し、非生理的環境下に置くことにほかならない。特に、脳腫瘍治療に用いる際には、in vivo において脳腫瘍細胞から分泌された cytokine や chemokine、細胞外マトリックスなどのニッチ因子が間葉系幹細胞の挙動を変化させる可能性や、間葉系幹細胞が何らからの因子が分泌され脳腫瘍細胞の挙動を変化させる可能性が否定できない。この考えを支持するように近年、間葉系幹細胞は乳癌の転移を促進することが明らかになった (Karnoub et al. Nature 2007)。間葉系幹細胞は乳癌内に限局し、そこで腫瘍関連間質に融合する。

(3) また、乳癌細胞との共存環境下において間葉系幹細胞から chemokine の産生が誘導され、それにより乳癌細胞が転移能や浸潤能を獲得もしくは促進されていることが証明された。同様に脳腫瘍においても、間葉系幹細胞が chemokine などの de novo 分泌を誘発しパラクライン的に腫瘍細胞に作用して、増殖能や浸潤能を増大させる可能性があるのであれば臨床応用に際して障壁となる可能性がある。この作用機序を解明することにより間葉系幹細胞と脳腫瘍細胞の細胞間 cross talk を抑制することができれば、安全性の確立と共に治療効率をさらに向上させることができるかと期待される。

2. 研究の目的

我々は、高濃度の β IFN を産生する間葉系幹細胞が脳腫瘍治療効果を有することを証明した (Nakamizo A, Cancer Res 2005)。しかしながら同研究では、間葉系幹細胞自体は脳腫瘍の増殖を助長している可能性が示唆さ

れた。そこで、本研究においては、間葉系幹細胞が脳腫瘍増殖に及ぼす影響を解析することを目的とした。また、両者の間で cytokine や chemokine を介した細胞間 cross talk が存在するかどうかについても検討する。我々が行った migration assay において、U87 グリオーマ細胞培養プレートから抽出した conditioned medium に対して間葉系幹細胞が tropism を有することから、脳腫瘍細胞から何らかの因子が分泌されているのは確実と考えられる。間葉系幹細胞から分泌され脳腫瘍細胞の挙動を制御している因子を特定することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 合計細胞数を 5×10^5 個として、U87 グリオーマ細胞とヒト間葉系幹細胞を 0:100、1:99、10:90、50:50、100:0 の割合で 5 cm dish に plate して 1、3、5、7 日に細胞数を計測し、Growth curve を描き、間葉系幹細胞が脳腫瘍細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。

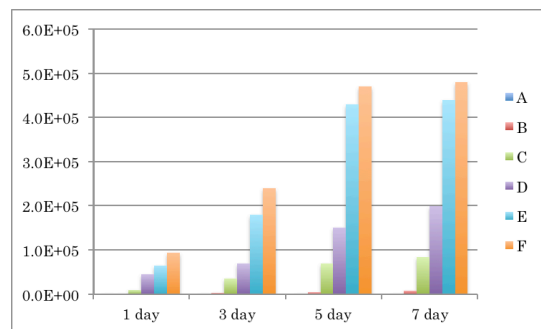
(2) 次に、5 cm dish に 5×10^5 個の U87 グリオーマ細胞を plate して、0 個、 1×10^3 個、 1×10^4 個、 5×10^4 個、 7×10^4 個、 1×10^5 個のヒト間葉系幹細胞を co-culture し、1、3、5、7 日に細胞数を計測し、間葉系幹細胞が脳腫瘍細胞の増殖を加速させていることを確認した後に、上清を回収して液性因子の分泌を測定した。VEGF、bFGF、TGF β 1、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、MMP13、MMP1、IL-1 β 、IL-8、IL-10、IL-13、CCL3、CCL-4、CCL-5 の上清中の分泌を BIORAD Model 680XR を用いて ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

(1) Plate 後 7 日目では、U87 グリオーマ細胞とヒト間葉系幹細胞の割合が 0:100、1:99、10:90、50:50、100:0 の dish において、細胞数はそれぞれ 4.8×10^5 個、 6.0×10^5 個、

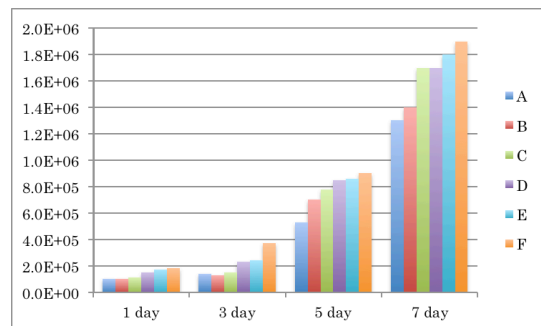
14.0×10^5 個、 27.6×10^5 個、 36.8×10^5 個であった。ヒト間葉系幹細胞の増殖が非常に緩徐であることを考えると、1:99 の割合の dish から既に増殖促進効果が得られていた。特に、10:90、50:50 の割合の dish では、U87 グリオーマ細胞の細胞数は予測された数の 1.5 倍程度に増加していた。次に、5 cm dish に 5×10^5 個の U87 グリオーマ細胞を plate して、0 個、 1×10^3 個、 1×10^4 個、 5×10^4 個、 7×10^4 個、 1×10^5 個のヒト間葉系幹細胞を co-culture し、1、3、5、7 日に細胞数を計測し、間葉系幹細胞が脳腫瘍細胞の増殖を加速させていることを確認した。

MSC のみの growth curve



- A: MSC 0 個
- B: MSC 1×10^3 個
- C: MSC 1×10^4 個
- D: MSC 5×10^4 個
- E: MSC 7×10^4 個
- F: MSC 1×10^5 個

MSC と U87 の co-culture での growth curve

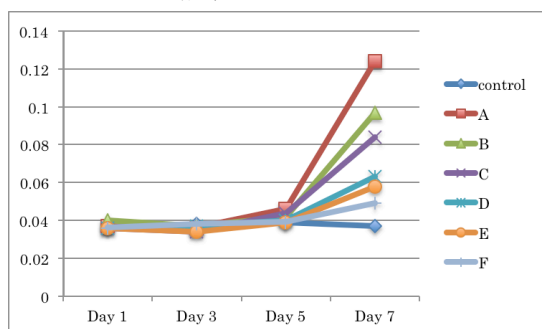


- A: U87 1×10^5 個, MSC 0 個
- B: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^3 個
- C: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^4 個
- D: U87 1×10^5 個, MSC 5×10^4 個

E: U87 1×10^5 個, MSC 7×10^4 個
 F: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^5 個

(2) VEGF、bFGF、TGF β 1、MMP1、MMP9、MMP13、MMP1、IL-1 β 、IL-8、IL-10、IL-13、CCL3、CCL-4、CCL-5 では間葉系幹細胞の存在による分泌の差は見られなかった。一方、グリオーマの浸潤や遊走において重要な役割を果たしていると考えられる MMP2 と MMP3 では、間葉系幹細胞の割合の増加に従って、グリオーマ細胞からの分泌が抑制されていることが確認された。以上より、間葉系幹細胞は cell-cell contact あるいは未知の液性因子によってグリオーマ細胞の増殖を加速させること、また、グリオーマ細胞からの MMP2 と MMP3 の分泌を抑制することが証明された。

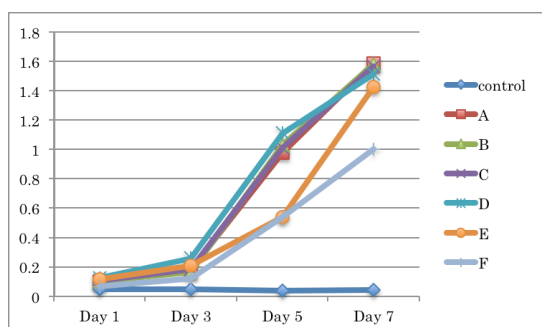
MMP3 ELISA の結果



Control: medium のみ

A: U87 1×10^5 個, MSC 0 個
 B: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^3 個
 C: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^4 個
 D: U87 1×10^5 個, MSC 5×10^4 個
 E: U87 1×10^5 個, MSC 7×10^4 個
 F: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^5 個

MMP2 ELISA の結果



Control: medium のみ

A: U87 1×10^5 個, MSC 0 個
 B: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^3 個
 C: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^4 個
 D: U87 1×10^5 個, MSC 5×10^4 個
 E: U87 1×10^5 個, MSC 7×10^4 個
 F: U87 1×10^5 個, MSC 1×10^5 個

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中溝 玲 (NAKAMIZO AKIRA)

九州大学・大学院医学研究院脳神経外科

講師
研究者番号：80529800

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：