

## 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25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591611

研究課題名（和文） グリオーマ動物モデルを用いたグリオーマ幹細胞ニッチと増殖・浸潤・血管新生の解明

研究課題名（英文） Analysis of glioma cell proliferation, invasion, and angiogenesis in glioma stem cell niche using animal glioma models

研究代表者

市川 智継 (ICHIKAWA TOMOTSUGU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：10362964

研究成果の概要（和文）：浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルを用いて、グリオーマ幹細胞ニッチにおける、増殖・浸潤・血管新生について、組織学的、分子生物学的に検討を行った。グリオーマ幹細胞のニッチは新生血管の周囲に存在し、幹細胞はここで分裂と浸潤を繰り返し、腫瘍を拡大していると考えられた。グリオーマ幹細胞、血管内皮、基底膜、周囲のグリア細胞、神経細胞などによって構成される微小環境について、組織学的に検討した。

研究成果の概要（英文）： Invasion, angiogenesis, and proliferation of malignant gliomas are fundamental traits and major reasons for treatment failure. These traits are considered to originate from glioma stem cell niche. Delineation of glioma stem cell niche is important in establishing treatment for gliomas. We have established two animal models that histologically recapitulated two invasive and angiogenic phenotypes, namely angiogenesis-dependent (J3T-1) and -independent (J3T-2) invasion, also observed in human glioblastoma. GFP-expressing J3T-1G cells were inoculated to establish brain tumors in athymic rats. Pathological samples of these animal gliomas were examined to analyze proliferation, invasion, and angiogenesis in relation to glioma stem cell niche. J3T-1G tumor showed remarkable angiogenesis, and glioma cells clustered around newly developed vessels at tumor borders. For dynamic analysis, slice culture of rat brain harboring glioma was monitored by timelapse imaging. Cell division of J3T-1G cells were seen around vasculature. Tumor cells migrated along external space of vascular channel. Our results indicated glioma niche exists around vasculature. Microenvironment of glioma stem cell niche was shown histologically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・脳神経外科学

キーワード：腫瘍幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、局所においては高い増殖能により腫瘍塊を形成し、その周囲には広範かつびまん性に浸潤し、さらに腫瘍に血管新生を誘導することを特徴とする。近年の診断技術・治療方法の進歩にもかかわらず、悪性グリオーマは依然として予後不良の疾患であるが、その原因のひとつは、腫瘍の増殖、浸潤、血管新生といった根本的な病態について、グリオーマ発生段階から統合的な研究がなされていないことにある。一方、再生医療研究の分野では、様々な細胞・組織の発生について、幹細胞の研究が盛んにおこなわれている。腫瘍も同様に、幹細胞の性質(自己複製能、多分化能、定着能)をもった腫瘍幹細胞を起源として発生すると言われている。この腫瘍幹細胞は、「ニッチ(niche)」と呼ばれる、生物体内で腫瘍幹細胞を維持する微小環境の中に存在していると推定されている。悪性グリオーマにおいては、CD133 陽性グリオーマ幹細胞の存在が証明されているが、生体内での分布は明らかにされておらず、したがってグリオーマ幹細胞のニッチについては、それがどこにあるのかさえ解明されていない。我々はこれまで、オリジナルの浸潤性グリオーマ動物モデルを用いて浸潤能の解析研究を行ってきたが、組織学的検討から、腫瘍増殖先端において少数の腫瘍細胞が血管周囲にまとわりつき、増殖しながら血管新生を誘導し、さらにそこを起点として浸潤していることをつきとめている。このような所見は、ヒト悪性グリオーマ標本の検討結果と非常に近似しており、腫瘍増殖先端の血管周囲にニッチが存在し、増殖と浸潤、血管新生が密接な関係をもって起こっていると推測される。こ

れら一連の病態を同時に把握する実験系として、我々のモデルは理想的といえる。本研究では、浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルを用いて、グリオーマ幹細胞ニッチの微小環境解明と、増殖、浸潤、血管新生の病態解明に関して統合的な研究を行う。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、グリオーマ幹細胞のニッチがどこにあるかを探索し、ニッチの内部でどのように増殖・浸潤・血管新生がおこっているかというグリオーマの本質的な病態の解明である。そのために、動物脳内で浸潤性の増殖と血管新生を示すオリジナルの動物モデルを用いて、時間的、空間的にダイナミックな組織学的解析を行う。我々は、浸潤増殖性悪性グリオーマ固定標本の組織学的検討から、増殖先端部の血管周囲の腫瘍細胞集団の中にグリオーマ幹細胞ニッチがあると推定しており、まずCD133 などのマーカーを用いてここにグリオーマ幹細胞の存在を証明する。次に、電子顕微鏡、免疫組織化学などの手法を用いて、ニッチの微小環境について検討を行う。さらに、動物モデルあるいはスライスカルチャーを用いてニッチ近傍でのグリオーマ幹細胞の動態を経時的に観察し、増殖、浸潤、血管新生がニッチを中心としてどのように起こっているかを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) GFP を発現する浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルの作成

本研究は、動物モデルを用いた実験が中心となるが、組織学的検討と分子生物学的検討を容易にするために、実験に用いるグリオーマ細胞にマーカー遺伝子を導

入する。ラット脳内で浸潤性増殖を示すイヌ悪性グリオーマ株 J3T-1 に、lipofection 法により GFP 遺伝子を導入し、GFP 定常発現 J3T-1 株を樹立する。実験で用いる細胞は、in vitro で selection を行った後に単クローンを抽出し、さらにラット脳内に移植して腫瘍原性を確認する。

#### (2) 浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルの組織学的検討

GFP 定常発現 J3T-1 株をラット脳内に移植し、浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルを作成する。この腫瘍の摘出標本を、蛍光顕微鏡を用いて組織学的に観察し、増殖、浸潤、血管新生について検討する。増殖速度は Ki-67 labeling index を定量し、浸潤については範囲を定量し、血管新生については分布範囲と内径、密度を定量する。

#### (3) グリオーマ幹細胞の同定

培養細胞ならびに動物モデルの中に、グリオーマ幹細胞がどの程度存在するかを検討する。まず培養細胞では、CD133 フローサイトメトリーまたはマイクロビーズ法による sorting でグリオーマ幹細胞分画を同定する。つぎに、動物モデルから腫瘍の生標本を摘出し、これを細胞単位に破碎して、培養細胞同様に sorting を行い、グリオーマ幹細胞分画を同定する。さらに、同定したグリオーマ幹細胞を in vitro で培養し、自己複製能を持つことを確認する。培養に戻したグリオーマ幹細胞については、どのような分子が発現しているかを、nestin や doublecortin など候補を絞って免疫染色あるいは western blotting 法により検討し、その中からグリオーマ幹細胞のマーカーの候補となるものを探し出す。

#### (4) グリオーマ幹細胞ニッチの部位同定と、組織学的、分子生物学的検討

浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルを作成し、摘出標本を、CD133 や nestin などに対する抗体で染色し、グリオーマ幹細胞のニッチが解剖学的にどこに存在するか同定する。さらに、グリオーマ幹細胞と増殖、浸潤、血管新生との関連について、HIF-1 や VEGF、integrin など特定分子の発現を、免疫染色により組織学的に検討する。また、電子顕微鏡を用いてニッチ内のグリオーマ幹細胞と、血管内皮、基底膜、周囲のグリア細胞、神経細胞などとの関係を詳細に検討し、ニッチの微小環境を解析する。

#### (5) グリオーマ幹細胞ニッチにおける増殖、浸潤、血管新生の動態解析

浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルから、腫瘍を含む脳スライスを作成し、スライスカルチャーを行う。これをタイムラプス法で観察し、グリオーマ幹細胞の動きを経時的に追跡する。この実験により、固定標本では不可能なリアルタイムでの動的な観察と記録が可能となる。グリオーマ幹細胞は、細胞分裂(自己複製)と移動(浸潤)をくりかえしていると考えられるが、本実験では、グリオーマ幹細胞の細胞分裂相と浸潤相の切り替わりを観察する。また、腫瘍幹細胞の移動の様子と血管の関係を観察する。

## 4. 研究成果

悪性グリオーマ幹細胞のニッチがどこにあるかを探索し、そこからどのように増殖・浸潤・血管新生がおこっているかというグリオーマの本質的な病態を解明する目的で、浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルを用いて研究を行った。

実験には、動物脳内で浸潤性の増殖と血管新生を示すオリジナルの培養細胞と動物モデルを用いた。まず、ラット脳内で浸潤性増

殖を示すイヌ悪性グリオーマ株 J3T-1 に、lipofection 法により GFP 遺伝子を導入した。導入細胞はまず培養条件下で selection をかけ、その後、単クローンをいくつか選択し、マウス脳内に移植し、腫瘍形成能がある細胞株を実験に使用した。

組織学的マーカーGFP を持つ腫瘍モデルを用いて、組織学的検討を行なった。さきを作成した GFP 定常発現 J3T-1 株(J3T-G)をラット脳内に移植し、浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルを作成した。この腫瘍の摘出標本を、蛍光顕微鏡を用いて組織学的に観察し、増殖、浸潤、血管新生について検討したところ、グリオーマ細胞は、新生血管の周囲に付着し、そこで増殖しながら、血管壁に沿って浸潤していることが判明した。したがって、グリオーマ幹細胞のニッチは解剖学的に新生血管の周囲に存在すると考えられた。さらに、増殖速度、血管新生の程度、浸潤速度などについて定量的な解析を行った。

つぎに、グリオーマ幹細胞の同定と、グリオーマ幹細胞ニッチの部位同定のため、組織学的、分子生物学的検討を行った。

培養細胞ならびに動物モデルの中に、グリオーマ幹細胞がどの程度存在するかを検討した。培養細胞を用いて、CD133、PSF-1、nestin や doublecortin 等の幹細胞マーカー候補に対する抗体で免疫染色をおこなった。その結果、PSF-1 陽性細胞の存在を認めた。

浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルを作成し、摘出標本を、CD133、PSF-1、nestin や doublecortin 等の幹細胞マーカー候補に対する抗体で染色し、グリオーマ幹細胞の組織学的存在部位を同定した。これらは腫瘍幹細胞ニッチの存在部位を示していると考えられ、さらに、グリオーマ幹細胞と増殖、浸潤、血管新生との関連について、HIF-1 や VEGF、integrin など特定分子の発現を、免疫染色によ

り組織学的に検討した。また、グリオーマ幹細胞ニッチの、グリオーマ幹細胞、血管内皮、基底膜、周囲のグリア細胞、神経細胞などによって光生される微小環境について、組織学的に検討した。

浸潤増殖性悪性グリオーマ動物モデルのスライスカルチャーを行い、タイムラプス法でグリオーマ幹細胞の動きを経時的に追跡した。その結果、グリオーマ幹細胞は、血管を中心として、細胞分裂と移動(浸潤)をくりかえしながら、腫瘍塊を拡大していることが判明した。

## 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 16 件)

1. Bimodal anti-glioma mechanisms of cilengitide demonstrated by novel invasive glioma models Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Fujii K, Yoshida K, Inoue S, Michiue H, Chiocca EA, Kaur B, Date I Neuropathology 2013; 33, 162-174 doi:10.1111/j.1440-1789.2012.01344.x 査読有
2. 外科的摘出および定位放射線治療が有用であった転移性滑膜肉腫の 1 例 大谷理浩、市川智継、黒住和彦、柳井広之、国定俊之、尾崎敏文、伊達 勲 脳神経外科 41(3): 255-262, 2013 査読有
3. Maruo T, Ichikawa T, Kanzaki H, Inoue S, Kurozumi K, Onishi M, Yoshida K, Kambara H, Ouchida M, Shimizu K, Tamaru S, Chiocca EA, Date I. Proteomics-based analysis of invasion-related proteins in malignant gliomas. Neuropathology. 2012 Nov 1. doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01361.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23116197. 査読有
4. Cilengitide treatment of for malignant glioma: Current status and future direction Kurozumi K, Ichikawa T, Onishi M, Fujii K, Date I Neurologica medico-chirurgica 52(8): 539-547, 2012 査読有
5. Novel animal glioma models that separately exhibit two different

- invasive and angiogenic phenotypes of human glioblastomas Inoue S, Ichikawa T, Kurozumi K, Maruo T, Onishi M, Yoshida K, Fujii K, Kambara H, Chiocca EA, Date I World Neurosurgery 78(6): 670-682, 2012 DOI: 10.1016/j.wneu.2011.09.005 査読有
6. Role of VEGF and matrix metalloproteinase-9 in peritumoral brain edema associated with supratentorial benign meningiomas. Iwado E, Ichikawa T, Kosaka H, Otsuka S, Kambara H, Tamiya T, Kondo S, Date I. Neuropathology 32: 638-646, 2012 doi:10.1111/j.1440-1789.2012.01312.x 査読有
  7. Therapeutic effect of suicide gene-transferred mesenchymal stem cells in a rat model of glioma Kosaka H, Ichikawa T, Kurozumi K, Kambara H, Inoue S, Maruo T, Nakamura K, Hamada H, Date I Cancer Gene Therapy 19(8): 572-578, 2012 doi:10.1038/cgt.2012.35 査読有
  8. Overheated and melted intracranial pressure transducer as cause of thermal brain injury during magnetic resonance imaging Tanaka R, Yumoto T, Shiba N, Okawa M, Yasuhara T, Ichikawa T, Tokunaga K, Date I, Ujike Y Journal of Neurosurgery 117(6): 1100-1109, 2012 査読有
  9. Angiogenesis and invasion in glioma Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I Brain Tumor Pathology 28(1): 13-24, 2011 査読有
  10. Primary germinoma in the medulla oblongata: Case report Yasuhara T, Ichikawa T, Miyoshi Y, Kurozumi K, Maruo T, Yanai H, Date I Neurologia medico-chirurgica(Tokyo) 51(4): 326-329, 2011 査読有
  11. "Double stick tape" technique for transposition of an offending vessel in microvascular decompression: Technical case report Ichikawa T, Agari T, Kurozumi K, Maruo T, Satoh T, Date I Neurosurgery 68(ONS Suppl 2): ons375-ons376, 2011 査読有
  12. Mixed germ cell tumor and hemangioblastoma in the cerebellum: report of a rare coexistence Ichikawa T, Hamazaki S, Sakai N, Otsuki Y, Wataya T, Kambara H, Shuin T, Date I Brain Tumor Pathology 28: 279-284, 2011 査読有
  13. 顕微鏡手術における神経内視鏡の役割—神経内視鏡と顕微鏡の使い分けの現状分析を中心に—小野成紀、石田穠治、安原隆雄、黒住和彦、市川智継、伊達 勲 脳神経外科ジャーナル 20(10): 716-724, 2011 査読有
  14. 小児テント上悪性星細胞腫瘍に対する外科治療を含めた集学的治療の成績 黒住和彦、市川智継、小野成紀、伊達 勲 小児の脳神経 36(5): 467-272, 2011 査読有
  15. 浸潤をターゲットとした分子標的治療 大西 学、黒住和彦、市川智継、伊達 勲 日本臨床 68(Suppl 10): 506-510, 2010 査読有
  16. ウイルス療法の新潮流 市川智継、黒住和彦、吉田光一、伊達 勲 日本臨床 68(Suppl 10): 478-482, 2010 査読有
- [学会発表] (計 112 件)
1. 第 23 回日本間脳下垂体腫瘍学会: 鹿児島, 2013.03.15 小児頭蓋咽頭腫の長期予後解析に基づく手術戦略 市川智継
  2. 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会: 広島, 2012.11.25 悪性グリオーマ浸潤形態規定因子annexin A2 の同定と浸潤性脳腫瘍モデルを用いた検討 市川智継
  3. 第 28 回悪性リンパ腫 (M.K.) 研究会: 郡山, 2012.11.17 中枢神経原発リンパ腫の診断と治療 (特別講演) 市川智継
  4. (社)日本脳神経外科学会第 71 回学術総会: 大阪, 2012.10.19 中枢神経原発リンパ腫に対する大量MTX多剤併用療法—初期寛解導入の重要性— 市川智継
  5. 第 1 回せとうち小児がんセミナー: 岡山, 2012.10.5 小児脳腫瘍の診断と治療 市川智継
  6. European Association of Neurooncology 10th Meeting: Marseille, France, 2012.09.07 Bimodal anti-glioma mechanisms of cilengitide demonstrated by novel invasive glioma models Ichikawa T
  7. 第 26 回中国地方脳神経外科手術研究会: 山口, 2012.08.25 頭蓋咽頭腫手術における神経内視鏡支援の役割 市川智継
  8. 第 12 回日本術中画像情報学会学術大会: つくば, 2012.07.07 次世代脳神経外科手術室の構築—周術期画像情報管理システム (PICS) の導入— 市川智継
  9. 第 40 回日本小児神経外科学会: 岡山, 2012.06.07 小児頭蓋咽頭腫の長期予後解析に基づく手術戦略 市川智継
  10. 第 21 回脳神経外科手術と機器学会: 大阪, 2012.03.30 神経血管減圧術における fibrin-collagen sheet (TachoComb)

- を用いた責任血管移動固定法 市川智継
11. 第 25 回日本老年脳神経外科学会：松本，2012. 03. 16 高齢者中枢神経原発リンパ腫に対する個別化治療方針 市川智継
  12. 第 14 回日本脳神経減圧術学会：東京，2012. 01. 19 神経血管減圧術における fibrin-collagen sheet (TachoComb) を用いた責任血管移動固定法 市川智継
  13. 第 16 回関西脳神経外科手術研究会：大阪，2011. 12. 17 小児頭蓋咽頭腫に対する根治性と機能温存の両立を目指した手術戦略 市川智継
  14. 第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会：下呂，2011. 11. 27 中枢神経原発リンパ腫に対する M-CHOP 療法—初期寛解導入の重要性— 市川智継
  15. (社) 日本脳神経外科学会第 70 回学術総会：横浜，2011. 10. 12 小児脳腫瘍に対する造血幹細胞移植併用大量化学療法への役割 市川智継
  16. 如月会学術講演会：福山，2011. 09. 26 マルチモダリティを駆使した脳腫瘍の診断と治療 市川智継
  17. 第 16 回日本脳腫瘍の外科学会：横浜，2011. 09. 09 小児頭蓋咽頭腫の長期予後解析に基づく治療戦略—根治性と機能温存の両立を目指して— 市川智継
  18. 第 78 回福山 MRI 勉強会：福山，2011. 04. 21 脳腫瘍—マルチモダリティを駆使した診断から治療まで— 市川智継
  19. 第 20 回日本脳神経外科手術と機器学会：徳島（抄録発表），2011. 04 神経血管減圧術における fibrin-collagen sheet (TachoComb) を用いた責任血管移動固定法 市川智継
  20. 第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会：軽井沢，2010. 11. 29 中枢神経原発リンパ腫に対する個別化治療戦略 市川智継
  21. (社) 日本脳神経外科学会第 69 回学術総会：福岡，2010. 10. 29 高齢者中枢神経原発リンパ腫に対する PBSCT 併用超大量科化学療法 市川智継
  22. 第 15 回日本脳腫瘍の外科学会：大阪，2010. 10. 01 全摘出を目指す ependymoma の手術戦略 市川智継

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

市川 智継 (ICHIKAWA TOMOTSUGU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
講師  
研究者番号：10362964

### (2) 研究分担者

黒住 和彦 (KUROZUMI KAZUHIKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
講師  
研究者番号：20509608

### (3) 連携研究者

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

三好 康之 (MIYOSHI YASUYUKI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：00362997

小野 成紀 (ONO SHIGEKI)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40335625