

## 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 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791343

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫における腫瘍幹細胞を標的とした間葉系幹細胞療法の試み

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell therapy targeting glioblastoma stem cell.

研究代表者

木嶋 教行 (KIJIMA NORIYUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：80534627

研究成果の概要(和文):

悪性神経膠腫手術例から得た臨床検体を対象とした検討で、CD166/ALCAM(Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule)が悪性神経膠腫幹細胞の条件を満たす分子であることを見出した。

さらに我々は CD166/ALCAM の悪性神経膠腫における機能的役割を検討し、CD166/ALCAM は細胞増殖には関係はないが、浸潤の抑制に関連している分子であることを見出した。さらに CD166/ALCAM は soluble isoform があることが知られており、soluble CD166/ALCAM の機能的役割についても検討を行ったところ、soluble isoform CD166/ALCAM は浸潤を促進する分子であることを見出し、さらにこの soluble CD166/ALCAM を発現させた U87MG グリオーマ細胞株は免疫不全マウスへの投与では明らかに腫瘍形成が促進されていることを見出した。これらの結果より悪性神経膠腫の治療ターゲットとなりうる分子として soluble isoform CD166/ALCAM が考えられる。現在この標的遺伝子を導入した間葉性幹細胞療法の可能性について検討中である。

研究成果の概要(英文):

Prognosis of glioblastoma multiforme (GBM) patients still remains poor. To improve it, it is important to identify GBM progenitor cells and target them. In this study, we found that CD166/ALCAM(Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule)was highly expressed on the CD133<sup>+</sup> GBM progenitor cell populations. In the CD133<sup>+</sup> GBM cell population, CD166/ALCAM<sup>+</sup> cells were highly enriched with tumor-sphere-initiating cells *in vitro*. We also found that the frequencies of CD166/ALCAM<sup>-</sup>positive cells on tumor specimens were significantly correlated with the WHO histological grade of glioma and the prognosis of GBM patients. The function of CD166/ALCAM in GBM was also examined. Transfection of CD166/ALCAM siRNA to U87MG cells significantly increased cell invasion in matrigel invasion assay without affecting cell proliferation. Furthermore, over-expression of soluble CD166/ALCAM in U87MG GBM cells promoted tumor progression in intracranial transplant to immune-deficient mice. In summary, CD166/ALCAM can be a new GBM progenitor marker and also a prognostic marker, and is involved in the regulation of GBM invasion. In addition, soluble CD166/ALCAM which is also expressed in GBM cells, promote GBM invasion, suggesting that soluble CD166/ALCAM is a potent therapeutic target against GBM. Now we are investigating whether soluble CD166/ALCAM is a potent therapeutic target for mesenchymal stem cell therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：悪性神経膠腫、癌幹細胞、間葉性幹細胞、細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は薬剤および放射線感受性が低く、他の固形悪性腫瘍と比較しても極めて予後不良な疾患である。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。世界中では、悪性神経膠腫に対する新しい治療法として、EGFR受容体の働きを抑える抗体やEGFR tyrosine kinaseの阻害薬、VEGFレセプターに対する抗体療法など、分子標的薬剤の開発が行われている。

また腫瘍幹細胞の概念が提唱され、その研究の進歩には目覚ましいものがある。悪性脳腫瘍内の癌細胞株にも組織内幹細胞と同様の自己複製能、多分化能、腫瘍形成能を有する少数の細胞(腫瘍幹細胞)が認められている。つまり脳腫瘍に治療を効率よく治癒および縮小に導くためには、このような腫瘍幹細胞と考えられる細胞群の制御が不可欠と考えられる。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多分化能、薬剤耐性能、腫瘍形成能を有する少数の腫瘍幹細胞を分離する技術が開発されてきており、癌治療の重要な標的としてその性状解析を行っていくことは、腫瘍の発生過程を理解し腫瘍に効果的な治療法を開発していくために有効なことと考える。

しかし、悪性神経膠腫に対する治療におけ

る問題点として、血液脳関門の存在などが挙げられ、これらにより種々の抗体や抗癌剤が腫瘍組織へ到達することが妨げられ、治療成績が向上しない原因と考えられている。この問題点を解決すべく神経幹細胞や間葉系幹細胞(Nakamizo A et al. Cancer Res. 2005)を遺伝子の担体として用いた細胞療法の研究が行われるようになった。それらの幹細胞が腫瘍組織へ特異的に浸潤していることが報告され、これらを用いた治療法が有効である可能性が報告されるようになった(Menon LG et al. Stem Cells. 2009)。現在までの研究では、神経幹細胞や間葉系幹細胞内に、Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk)などの自殺遺伝子を利用した方法、apoptosisを誘導するTumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)などを導入した研究が行われている。しかし、幹細胞の遊走する位置での局所的な制御は得られても、最も抵抗性の強い腫瘍幹細胞の制御という点で疑問が残るのが現状である。

また、神経幹細胞はstem cell therapyを行うにあたり調達が困難で倫理的な問題も孕んでいる。それに対して、血液や脂肪細胞をリソースとした幹細胞療法が可能であれば、臨床応用への道が広がる可能性があると思われる。

また更に解決すべき問題点としては、幹細胞を利用した治療における安全性や分子

標的治療の有効性の確立と考える。最近のES細胞やiPS細胞研究の進歩や臨床応用への研究で、幹細胞の腫瘍化などが問題となっている。また、最近、腫瘍幹細胞と正常幹細胞が自己複製の際に共通の分子経路を使用していることが明らかとなった (Clarke M et al. Cell. 2009)。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて悪性神経膠腫における腫瘍幹細胞の性状解析を行い、その遺伝子をターゲットとした治療を行うことを計画している。その遺伝子をターゲットとした治療を行う際に間葉系幹細胞を用いることで、治療効果があるかどうかを検討することを計画している

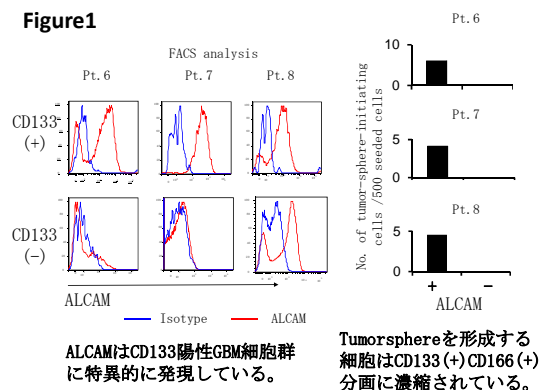
このような研究を行うことで悪性神経膠腫における新たな遺伝子治療の可能性に道筋をつけ、悪性神経膠腫の治療成績の向上に寄与しようとするものである。

## 3. 研究の方法

悪性神経膠腫手術例から得た臨床検体計21例を対象とした。腫瘍幹細胞の分離・同定は、neurosphere法に加え、当院の癌幹細胞制御学講座とともに確立したFACSを用いた方法にて腫瘍幹細胞を濃縮する方法を用いた。得られたCD133陽性分画の細胞表面に存在する分子をsignal sequence trap法や採取したmRNAを使用しmicroarray法にてCD133陰性分画との遺伝子発現比較により候補遺伝子を選択し、CD133陽性分画に発現する分子の同定を試みた。さらに、フローサイトメトリーを用いて膠芽腫検体で候補分子

の発現とCD133の発現との関係を蛋白レベルで検討し、CD133+細胞に高発現する分子を同定を試みた。その結果CD166/ALCAM(Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule)が上記の条件を満たす分子であることを見出した。

Figure1



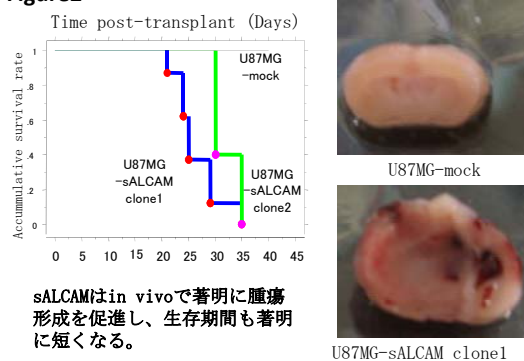
さらに我々はCD166/ALCAMの悪性神経膠腫における機能的役割を検討した。具体的にはsiRNA、shRNAによるノックダウンを行い、その後機能の解析方法としては1) Transwellを用いたmigration、2)細胞増殖能の評価、3)Zymographyを用いたMMP-2/9活性の測定、4)免疫不全マウス胎児脳への移植による造腫瘍活性、増殖、浸潤能の評価を行った。

## 4. 研究成果

CD166/ALCAMは細胞増殖には関係はないが、浸潤の抑制に関連している分子であることを見出した。さらにCD166/ALCAMはsoluble isoformがあることが知られており、soluble CD166/ALCAMの機能的役割についても同様の検討を行ったところ、soluble isoform CD166/ALCAMは浸潤を促進する分子であることを見出し、さらにこのsoluble CD166/ALCAM

を発現させた U87MG グリオーマ細胞株は免疫不全マウスへの投与では明らかに腫瘍形成が促進されていることを見出した。

Figure2



これらの結果より悪性神経膠腫の治療ターゲットとなりうる分子として soluble isoform CD166/ALCAM が考えられる。現在この標的遺伝子を導入した間葉性幹細胞療法の可能性について検討中である。

## 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 1 件)

- ① Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Nakano A, Fujimoto Y, Kinoshita M, Sugiyama H, Yoshimine T.: CD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule is expressed on glioblastoma progenitor cells and involved in the regulation of tumor cell invasion. **Neuro Oncol.** 2011 Dec 13. [Epub ahead of print] DOI: 10.1093/neuonc/nor202

[学会発表] (計 9 件)

- ① 木嶋教行、悪性神経膠腫における CD166/ALCAM の発現とその機能的役割  
第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会、  
2011 年 11 月 27 日、岐阜
- ② Noriyuki Kijima, Brain tumor stem cell 4 (BTSC4) is expressed on glioblastoma progenitor cells and involved in the regulation of tumor cell invasion. 16th Annual Scientific Meeting of Society for NeuroOncology.  
2011 年 11 月 18 日、California, USA
- ③ 木嶋教行、悪性神経膠腫における CD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule の機能的役割  
第 16 回グリア研究会、2011 年 10 月 22 日、名古屋
- ④ 木嶋教行、悪性神経膠腫における CD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule の機能的役割  
第 12 回日本分子脳神経外科学会、2011 年 10 月 14 日、横浜
- ⑤ 木嶋教行、新規脳腫瘍幹細胞マーカー (BTSC4) が悪性神経膠腫の浸潤能へ及ぼす影響  
第 28 回日本脳腫瘍学会、2010 年 11 月 29 日、長野
- ⑥ 木嶋教行、悪性神経膠腫における新規脳腫瘍幹細胞マーカー-brain tumor stem cell marker4 (BTSC4) の機能的役割  
第 69 回日本脳神経外科学会総会、2010 年 10 月 27 日、福岡
- ⑦ 木嶋教行、悪性神経膠腫における新規脳腫瘍幹細胞マーカー-brain tumor stem cell marker4 (BTSC4) の機能的役割  
第 15 回グリア研究会、2010 年 10 月 23 日、福岡

- ⑧ 木嶋教行、Brain tumor stem cell 4 は  
グリオブラストーマ前駆細胞に発現し、  
腫瘍の進展に寄与する  
第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 24  
日、大阪
- ⑨ 木嶋教行、悪性神経膠腫における新規脳  
腫瘍幹細胞マーカー-brain tumor stem  
cell marker 4 (BTSC4) の機能的役割  
第 11 回日本分子脳神経外科学会、2010  
年 8 月 27 日、仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木嶋 教行 (KIJIMA NORIYUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい研  
究員

研究者番号：80534627

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし