

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390351

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞特異抗体を付加した薬物内包ミセルによる新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new anti-tumor therapy for malignant glioma using a drug incorporating polymeric micelle attached with a specific antibody for glioma cancer stem cell

研究代表者

倉津 純一 (KURATSU, Jun-ichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20145296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、悪性神経膠腫患者から手術時に得た細胞を継代培養せずに、ヌードマウスの皮下に植え込み、GSCを得るという方法を用いることで、グリオーマ癌幹細胞(GSC)の性質を保ったまま濃縮でき、GSCを豊富に含んだ腫瘍細胞を安定して使用できるようになった。ターゲットにするGSCに特異的な分子を探索したが、現在までに最適な分子の同定には至っていない。また、フィブリン糊にテモゾロマイド(抗腫瘍薬)を混濁させ、マウスの皮下に植え込んだ腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討したところ、有効性が認められ、テモゾロマイドを一つの候補薬剤としている。

最終的には、GSCに最も効果的な分子標的薬を選択したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We developed the method for concentrating and enriching Glioma stem cell(GSC) by subcutaneous implantation of malignant glioma cells into nude mice. By this method we could obtain tumor cells including abundant GSCs. We have been identifying a new molecule specific for GSC by some molecular biological techniques, however, we have not yet found the most suitable molecule. In parallel, we mixed temozolomide and fibrin glue and investigated the anti-tumor effect of this drug in the mouse model. We found the efficacy of this drug and we think we should search for an optimal molecular target drug.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：グリオーマ癌幹細胞(GSC) 薬剤内包ミセル GSC特異的細胞表面分子 ヌードマウス テモゾロマイド
分子標的薬剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性グリオーマは手術、放射線治療、化学療法などの集学的治療を行うにもかかわらず、治療成績の向上があまり得られていない疾患のひとつである。その理由として手術においては全摘出することは困難であり、必ず細胞レベルで残存するが、これらの残存腫瘍がその後の放射線治療や化学療法においても死滅させることができず、いずれ再発してくることによる。いわゆる放射線治療や化学療法に抵抗性の細胞が残存するのであるが、これらの細胞がグリオーマ癌幹細胞 (glioma cancer stem cell, 以後 GSC と略す) と考えられている。GSC の治療抵抗性のメカニズムに関してはいろいろ提唱されているが、まだ完全には解明されていない。しかし、GSC を認識する表面マーカーに関してはいくつか報告されており、これらの表面マーカーを認識する抗体も開発されている。

(2) 我々は、今までに様々な薬剤を内包できるミセルを用いた新しい薬剤デリバリーシステムを開発してきた。また、この薬剤内包ミセルの表面に特定の分子を認識する抗体を付加できるシステムも開発した。動物実験にてこの薬剤内包ミセルは、腫瘍特異的に集積することを確認した。

2. 研究の目的

前述のごとく、悪性グリオーマは放射線治療や化学療法に抵抗性を示すが、その抵抗性の克服が研究の目的である。我々は、治療抵抗性の原因は GSC が存在していることに起因すると考えており、GSC を特異的にターゲットにする治療法を開発を目標とした。GSC に特異的な表面マーカーを認識する抗体を作成し、それを薬剤内包ミセルの表面に付加し、これを投与することによって、GSC を細胞死に導くという GSC をターゲットにした治療法を実現化することが最終的な目的である。

3. 研究の方法

(1) GSC の樹立と GSC に特異的な分子の同定
GSC を患者手術サンプルより継代培養して獲得していたが、継代培養を続けることによって GSC の性質変化が認められることがわかった。このため、従来の方法から、手術サンプルを継代培養しないで、そのままヌードマウスの皮下に植え込み腫瘍を増大させて GSC を得るという方法に転換した。この方法によって GSC の性質を保ったまま GSC を増やして濃縮することができた。濃縮できた GSC を用いて、GSC に特異的な分子の同定を試みた。当初マイクロアレイという方法にて GSC と GSC 以外の腫瘍細胞にて発現レベルの異なる分子の同定を試み、いくつかの分子を同定した。更にプロテオミクスや様々な分子生物学的手法を用いて、GSC に特異的な分子の同定

と検証を繰り返した。

(2) 抗腫瘍効果を示す薬剤内包ミセルの開発

悪性グリオーマは臨床的に腫瘍栄養血管の血管透過性が亢進しており、また血液脳関門も破壊されていることが多い。これまでの実験にて、我々は薬剤内包ミセルが血液脳関門が破綻した腫瘍に特異的にデリバリーされることを見出している。以前は SN38 という DNA トポイソメラーゼの活性型の抗腫瘍薬を内包させて実験していたが、悪性グリオーマに更に有効な薬剤の利用を考案している。

(3) GSC を特異的に認識する抗体を付加した薬剤内包ミセルの開発

GSC を特異的な分子を同定し、それを特異的に認識する抗体を作成し、薬剤内包ミセルに付加するわけであるが、いくつかの分子を同定したところ、細胞内の分子では薬剤内包ミセルのデリバリーがうまくいかないことが判明したために、GSC に特異的な表面マーカーに絞って薬剤内包ミセルに付加し、GSC 特異的分子認識抗体付加の薬剤内包ミセルの開発をおこなった。

4. 研究成果

(1) GSC の安定した継代培養

当初、我々は悪性グリオーマの手術標本より得られたサンプルを GSC 用継代培地にて培養していたが、継代を繰り返すうちに形質変化が認められた。そこで、我々は手術より得られた悪性グリオーマの細胞をそのままヌードマウスの皮下に植え込み、生体で継代を繰り返すことにより GSC をかなり濃縮して採取することができた。これらを用いることによって GSC を安定して実験に使用できるようになった。

(2) GSC に特異的な表面マーカー分子の同定

GSC を特異的に認識する抗体を作成するには、GSC 特異的に発現する細胞表面の分子が望ましい。マイクロアレイを用いて GSC に特異的に発現する分子をいくつか同定したが、多くは細胞内の分子であり、抗体を作成した場合にその分子を認識する高率がかなり悪いことが判明した。そこで、細胞表面の分子に絞って GSC に特異的な分子の同定を試みたが、マイクロアレイではうまく同定できなかった。そこでプロテオミクス等の方法や、ゲノムレベルでのスニップマイクロアレイ法でも分子の同定を試みた。スニップマイクロアレイでは悪性グリオーマに強発現している EGFR、PDGFR、MET などの分子は同定できたが GSC に特異的ではなかった。GSC において従来より特異的マーカーとして報告されている CD133 という細胞表面の分子も同定されたので、他の分子が同定できない場合は、若干特異性に問題があるが使用可能と思われた。

(3) 抗腫瘍効果を示す抗がん剤の選択

悪性グリオーマに臨床的に有効とされる抗がん剤は限られており、アルキル化剤が最も一般的である。最近、ほとんどの臨床ではテモゾロマイドという薬剤が使用されている。我々はテモゾロマイドの GSC に対する有効性を検証するために、テモゾロマイドの注射液をフィブリンゲルに混濁させ動物モデルに投与することで、薬剤内包ミセルとして使用した場合と同様に徐放的な効果が得られないかを検証し、論文として発表した(S. Anai et al. Cancer Sci. 2014)。この結果、テモゾロマイドにおいて十分な抗腫瘍効果が得られることが確認でき(図1)、現在 GSC に対する抗腫瘍効果を検証している。

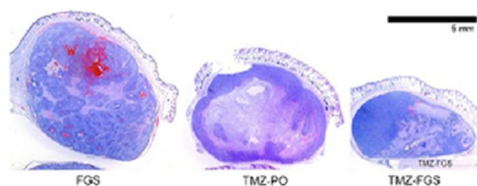


図1 悪性グリオーマ皮下腫瘍モデルにおけるテモゾロマイドとフィブリンゲルを混濁し投与した場合の抗腫瘍効果

(4) GSC が濃縮された悪性グリオーマサンプルの動物モデルの作成

我々は、最終的に薬剤内包ミセルを投与し、その効果を判定するためには GSC が豊富に存在する動物モデルが必要であり、ヌードマウスを用いたモデルの作成に成功した。手術で得られた悪性グリオーマの細胞をヌードマウスの皮下に植え込み継代していくことで、GSC が濃縮され、それを継代培養することで豊富な GSC を含む悪性グリオーマの細胞を安定して準備できるようになった。これらの細胞をヌードマウスの脳に植え込み、GSC 濃縮悪性グリオーマモデルとして使用可能であることを検証できた。今後このモデルで実験を進めていく予定である。

(5) GSC 特異的表面分子の同定に対する新たな試み

GSC に特異的な表面分子を同定することは、かなり困難であり、なかなか特異性を示す分子を絞り込めないというのが現状である。マイクロアレイやプロテオミクス等の分子生物学的方法を試みるも、最適な分子にヒットしていない。そこで我々は CD133 の抗体を用いて悪性グリオーマの細胞からソーティングしたものを次世代シーケンズ、エクソーム解析、および DNA のメチル化の解析を行うことを計画している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Takuichiro Hide(1 番目), Keishi Makino(2 番目), Hideo Nakamura(3 番目), Jun-ichiro Kuroda(7 番目), Jun-ichi Kuratsu(10 番目), (他 5 名): New Treatment Strategies to Eradicate Cancer Stem Cells and Niches in Glioblastoma. *Neurologia medico-chirurgica*, 査読有, 53(11), 2013, 764-772
<http://dx.doi.org/10.2176/nmc.ra2013-0207>

Yoshinobu Takahashi, Hideo Nakamura(2 番目), Keishi Makino(3 番目), Takuichiro Hide(4 番目), Jun-ichi Kuratsu(7 番目), (他 2 名): Prognostic value of isocitrate dehydrogenase 1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in Japanese Malignant glioma patients. *World Journal of Surgical Oncology*, 査読有, 11, 2013, 284
doi: 10.1186/1477-7819-11-284.

Naoki Shinjima, Tatsuya Takezaki, Jun-ichi Kuratsu(10 番目), (他 8 名): TGF- β mediates homing of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells to glioma stem cells. *Cancer Research*, 査読有, 73(7), 2013, 2333-2344
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3086.

Soichiro Shibui, Jun-ichi Kuratsu(12 番目), Hideo Nakamura(13 番目), (他 37 名): Randomized trial of chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with nimustine(ACNU) versus nimustine plus procarbazine for newly diagnosed anaplastic astrocytoma and glioblastoma (JCOG0305). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 査読有, 71(2), 2013, 511-521
doi: 10.1007/s00280-012-2041-5.

中村英夫, 倉津純一: 特集: 神経疾患の新しい治療 - 現場で必須の知識と今後の展望 - 脳腫瘍
日本内科学会雑誌, 査読無, 102(8), 2013 1952-1957
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/naika/-char/ja>

Keishi Makino(1 番目), Hideo Nakamura(2 番目), Takuichiro Hide(3 番目), Jun-ichiro Kuroda(5 番目), Jun-ichi

Kuroda (7番目), (他2名): Fatty acid synthase is a predictive marker for aggressiveness in meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 査読有, 109(2), 2012, 399-404
doi: 10.1007/s11060-012-0907-3.

Yutaka Ueda, Takuichiro Hide(3番目), Hideo Nakamura(7番目), Keishi Makino(8番目), Jun-ichi Kuratsu(9番目), (他6名): Induction of autophagic cell death of glioma-initiating cells by cell-penetrating D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus. *Biomaterials*, 査読有, 33(35), 2012, 9061-9069
doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.003.

Hideo Nakamura, Keishi Makino, Masato Kochi, Yukitaka Ushio, Jun-ichi Kuratsu: Evaluation of neoadjuvant therapy in patients with nongerminomatous malignant germ cell tumors. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 査読有, 7(4), 2011, 431-438
doi: 10.3171/2011.1.PEDS10433.

Hideo Nakamura, Keishi Makino, Yukitaka Ushio, Rouichi Arima, Jun-ichi Kuratsu: Therapy-associated secondary tumors in patients with non-germinomatous malignant germ cell tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 査読有, 105(2), 2011, 359-364
doi: 10.1007/s11060-011-0597-2.

Keishi Makino, Hideo Nakamura, Takuichiro Hide, Jun-ichi Kuratsu, Kumamoto Brain Tumor Group: Risk of primary childhood brain tumors related to season of birth in Kumamoto Prefecture, Japan. *Child's Nervous System*, 査読有, 27(1), 2011, 75-78
doi: 10.1007/s00381-010-1235-6.

Keishi Makino(1番目), Hideo Nakamura(3番目), Jun-ichi Kuratsu(13番目), (他10名): Does adding FDG-PET to MRI improve the differentiation between primary cerebral lymphoma and glioblastoma? Observer performance study. *Annals of Nuclear Medicine*, 査読有, 25(6), 2011, 432-438
doi: 10.1007/s12149-011-0483-1.

[学会発表](計9件)

1. 中村英夫: 悪性神経膠腫の遺伝子染色体異常と臨床的予後との相関解析、日本脳神経外科学会第72回学術総会、2013年10月17日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. Hideo Nakamura: Genetic alterations in glioma, 15th WFNS World Congress of Neurosurgery (招待講演), 2013年9月9日、Coex Convention Center(Seoul, Korea)
3. 中村英夫: Grade グリオーマにおける遺伝子変化と臨床的予後との関係、第30回日本脳腫瘍学会学術集会、2012年11月26日、グランドプリンス広島(広島県広島市)
4. Hideo Nakamura: Genetic alterations in glioma by using SNP-Microarray, The 10th Meeting of European Association of Neuro-oncology, 2012年9月7日、PARC CHANOT Convention & Exhibition Center (Marseille, France)
5. 牧野敬史: 頭蓋内非腫瘍性病変の鑑別診断における変異型IDH1抗体を用いた免疫組織染色の有用性の検討、第30回日本脳腫瘍病理学会、2012年5月26日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
6. Keishi Makino: Usefulness of immunohistochemistry using mutant IDH1 antibody to differentiate intracranial nonneoplastic lesions, 9th Meeting of Asian Society for Neuro-oncology, 2012年4月21日、Taipei International Convention Center(Taipei, Taiwan)
7. 秀 拓一郎: オリゴデンドロサイト前駆細胞の形質転換に伴う遺伝子発現の変化、第29回日本脳腫瘍学会学術総会、2011年11月28日、水明館(岐阜県下呂市)
8. 牧野敬史: 悪性脳腫瘍における fatty acid synthase の発現とその意義、日本脳神経外科学会第70回学術総会、2011年10月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
9. Hideo Nakamura: Molecular allelokaryotyping of malignant glioma by high-resolution single nucleotide polymorphism(SNP) oligonucleotide genomic microarray, International Symposium on Clinical and Basic Investigation in Glioblastoma/ Symposium Seve

Ballesteros Foundation, 2011年6月23日,
Santiago Grisolia Auditorium(Valencia,
Spain)

[その他]

熊本大学医学部附属病院 脳神経外科
ホームページ
[http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/
neurosurgery/](http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/neurosurgery/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉津 純一 (KURATSU, Jun-ichi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 20145296

(2) 研究分担者

中村 英夫 (NAKAMURA, Hideo)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30359963

牧野 敬史 (MAKINO, Keishi)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 90381011

秀 拓一郎 (HIDE, Takuichiro)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40421820

荒木 令江 (ARAKI, Norie)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 80253722

黒田 順一郎 (KURODA, Jun-ichiro)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 90536731