

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659645

研究課題名(和文) 膠芽腫に対する新規血管新生抑制療法：光線力学療法と合成ペプチド療法

研究課題名(英文) New antiangiogenic therapy for glioblastoma: photodynamic and synthetic peptide therapy

研究代表者

高野 晋吾 (Takano, Shingo)

筑波大学・学内共同利用施設等・病院講師

研究者番号：50292553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫の増殖制御を考え、血管新生因子FGF2特異的な抑制物質としてFGF2受容体に対するアンチセンスホモロジーボックス(AHB)に注目した。コンピュータープログラムによるすべての可能なAHBの探索により、FGF2受容体の標的ペプチドに対応する相補ペプチドを13種類合成した。合成ペプチドの血管新生抑制効果をin vitroヒト血管内皮細胞の増殖試験で確かめた。予想に反して、合成ペプチドに非常に強い内皮細胞増殖効果、FGF2シグナルの増強を認めた。FGF2受容体に対するAHBペプチドの血管新生促進効果の特異性を確かなものにして、さらにin vivo脳梗塞モデルでの血管新生療法を考案した。

研究成果の概要(英文)：As a specific inhibitor for angiogenic factor FGF2, we are interested in antisense homology box (AHB) in FGF2 receptor. Based on the computer analysis of FGF2 receptor, 13 synthetic peptides for AHB were designed. Human endothelial cell proliferation assay was determined with these peptides. Unexpectedly, some peptides demonstrated strong endothelial proliferation activity with elevated FGF2 signal transduction. Finally the angiogenic activity of the peptide was confirmed by other several assays. We propose AHB derived FGF2 receptor peptide is a candidate of angiogenic therapy for ischemic disease such as cerebral infarction.

研究分野：脳神経外科

キーワード：血管新生 膠芽腫 合成ペプチド FGF2 FGF2受容体 脳梗塞

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は血管新生が豊富であり、血管新生抑制療法が探索されてきた。強力な血管新生因子 VEGF に対する中和抗体 (bevacizumab) の膠芽腫に対する 2 つの大規模臨床試験では、bevacizumab は progression free survival は延長するが、overall survival は延長しないという結果であり、VEGF 中和抗体以外の血管新生抑制療法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

VEGF に次ぐ強力な血管新生因子である FGF2 を標的とした。また、FGF2 を抑制するのに、FGF2 受容体を構成するアミノ酸配列の中で、アンチセンスホモロジーボックス (AHB) にあたるペプチドを、コンピュータプログラムより探索し、それに対する相補ペプチドの効果を確認することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ペプチドの合成：FGF2 受容体の全アミノ酸配列より AHB を探索し、それぞれに対する相補的なペプチドを合計 13 個作成した。

内皮細胞増殖試験：ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) おとびヒトグリオーマ細胞 (U87, U251) を 96 well で培養し、13 個の合成ペプチド (0, 10, 100, 500, 1000 nM) を加えて 3 日後に、WST assay で細胞増殖を測定した。

内皮細胞シグナル伝達：HMVEC を 6 well で培養し、合成ペプチド (100 nM) を加えて細胞内の FGF2 シグナル (Akt, ERK, S6, それぞれのリン酸化蛋白) をウェスタン解析で測定した。

ペプチドの作用機序解明：ペプチドと内皮細胞の結合を生理学的に確かめるために、Biacore assay を行った。ペプチドによる内皮細胞の増殖作用が特異的なものであるこ

とを見るために、アミノ酸配列を 3 個変換した変換ペプチドを用いた HMVEC の増殖試験、あるいは HMVEC の FGFR2 を siRNA でノックダウンした内皮細胞を用いた増殖試験を行った。

### 4. 研究成果

合成ペプチドの内皮細胞増殖作用：13 個の合成ペプチドのうち、細胞外ドメイン、transmembrane ドメインの数個のペプチドで内皮細胞の増殖刺激作用がみられた。グリオーマ細胞では増殖刺激作用は見られなかった。

内皮細胞内シグナル伝達：上記の増殖刺激作用のあるペプチドのうち、最も強い作用のペプチドについて実験を行った。ペプチド 100nM の濃度で、HMVEC の細胞内シグナル (phospho-Akt, -ERK, -S6) の増強がみられた。

ペプチドの作用機序解明；2 種類の方法で Biacore assay を行った。FGFR2 の細胞外部分に対する抗体を装置に固定し、HMVEC を流して結合を見る実験、HMVEC を装置に固定し、ペプチドを流して結合を見る実験共に、生理学的には結合を認める所見は得られなかった。ペプチドの 3 個のアミノ酸を変換した変換ペプチドでは HMVEC の増殖作用は見られなかった。また、HMVEC の FGFR 受容体を siRNA でノックダウンするとペプチドの増殖作用は見られなかった。今回の研究で FGF2 受容体の AHB に対するペプチドには、予想に反して内皮細胞の増殖を刺激する作用を見出した。その作用は内皮細胞特異的であり、標的としたペプチド特異的であった。このペプチドは血管新生抑制ではなく、脳梗塞などの虚血性疾患に対する血管新生療法としての応用が考えられた。

### 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 18 件)

1. **Takano S**, Ishikawa E, Matsuda M, Yamamoto T, Matsumura A: Interferon- $\beta$  inhibits glioma angiogenesis through downregulation of vascular endothelial growth factor and upregulation of interferon inducible protein 10. *Int J Oncol*. 45: 1837-1846, 2014. Aug 25. doi: 10.3892/ijo.2014.2620.
2. **Takano S**, Ishikawa E, Nakai K, Matsuda M, Masumoto T, Yamamoto T, Matsumura A: Bevacizumab in Japanese Patients with Malignant Glioma from Basic Research to Clinical Trial. *OncoTargets Ther* 7: 1551-1562, 2014.
3. **Takano S**, Akutsu H, Hara T, Yamamoto T, Matsumura A: Correlations of vascular architecture and angiogenesis with pituitary adenoma histotype. *Int J Endocrinol* vol. 2014, Article ID 989574, 12 pages, 2014. doi:10.1155/2014/989574.
4. **Takano S**, Kin H, Tsuda K, Osuka S, Nakai K, Yamamoto T, Ishikawa E, Akutsu H, Matsuda M, Matsumura A. Decrease in the Apparent Diffusion Coefficient in Peritumoral Edema for the Assessment of Recurrent Glioblastoma Treated by Bevacizumab *Acta Neurochirurgica Supplement*, 118: 185-189, 2013. DOI 10.1007/978-3-7091-1434-6\_34
5. Kaneko MK, Morita S, Tsujimoto Y, Yanagiya R, Nasu K, Sasaki H, Hozumi Y, Goto K, Natsume A, Watanabe M, Kumabe T, **Takano S**, Kato Y. Establishment of novel monoclonal antibodies KMab-1 and MMab-1 specific for IDH2 mutations *Biol Biophys Res Commun* 432: 40-45, 2013
6. Hirohata T, Asano K, Ogawa Y, **Takano S**, Amano K, Isozaki O, Iwai Y, Sakata K, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S, Fujio S, Arita K, Takano K, Tominaga A, Hizuka N, Ikeda H, Osamura RY, Tahara S, Ishii Y, Kawamata T, Shimatsu A, Teramoto A, Matsuno A. DNA Mismatch Repair Protein (MSH6) Correlated With the Responses of Atypical Pituitary Adenomas and Pituitary Carcinomas to Temozolomide: The National Cooperative Study by the Japan Society for Hypothalamic and Pituitary Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 98\* 1130-1136, 2013. PMID: 23365123
7. Shibui S, Narita Y, Mizusawa J, Beppu T, Ogasawara K, Sawamura Y, Kobayashi H, Nishikawa R, Mishima K, Muragaki Y, Maruyama T, Kuratsu J, Nakamura H, Kochi M, Minamida Y, Yamaki T, Kumabe T, Tominaga T, Kayama T, Sakurada K, Nagane M, Kobayashi K, Nakamura H, Ito T, Yazaki T, Sasaki H, Tanaka K, Takahashi H, Asai A, Todo T, Wakabayashi T, Takahashi J, **Takano S**, Fujimaki T, Sumi M, Miyakita Y, Nakazato Y, Sato A, Fukuda H, Nomura K. Randomized trial of chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with nimustine (ACNU) versus nimustine plus procarbazine for newly diagnosed anaplastic astrocytoma and glioblastoma (JCOG0305). *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 511-521, 2013. doi: 10.1007/s00280-012-2041-5.
8. Akimoto K, Kimura K, Nagano M, **Takano S**, To'a Salazar G, Yamashita T, Ohneda O. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem

- cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. *Stem Cells Dev.* 22:1370-1386, 2013. doi: 10.1089/scd.2012.0486.
9. Muroi A, **Takano S**, Fukushima T, Shimizu T, Matsumura A: Intracranial germinoma manifesting as cavernous sinus syndrome--case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(10):754-6. PMID: 23095271
  10. Nagane M, Nishikawa R, Narita Y, Kobayashi H, **Takano S**, Shinoura N, Aoki T, Sugiyama K, Kuratsu J, Muragaki Y, Sawamura Y, Matsutani M: Phase II study of single-agent bevacizumab in Japanese patients with recurrent malignant glioma. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Oct;42(10):887-95. Epub 2012 Jul 27. PMID: 22844129
  11. **Takano S**, Matsumura A: Topics for antiangiogenic therapy for glioblastoma]. *No Shinkei Geka*. 2012 Jun;40(6):481-502. Review. Japanese. No abstract available. PMID: 22647508
  12. Ishikawa E, **Takano S**, Ohno T, Tsuboi K: Adoptive cell transfer therapy for malignant gliomas. *Adv Exp Med Biol*. 2012;746:109-20. doi: 10.1007/978-1-4614-3146-6\_9. Review. PMID: 22639163
  13. Takase H, Matsumoto K, Yamadera R, Kubota Y, Otsu A, Suzuki R, Ishitobi H, Mochizuki H, Kojima T, **Takano S**, Uchida K, Takahashi S, Ema M: Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo. *Blood*. 2012 Jul 26;120(4):914-23. doi: 10.1182/blood-2011-12-398156. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22535667
  14. Sakamoto N, Uemae Y, Ishikawa E, **Takano S**, Nakai K, Yamamoto T, Zaboronok A, Matsumura A: Glioma immunotherapy with combined autologous tumor cell and endothelial cell vaccine in vivo. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(4):194-201. PMID: 22522329
  15. Osuka S, **Takano S**, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A: Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(4):186-93. PMID: 22522328
  16. **Takano S**, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, Matsuda M, Nakai K, Yanagiya R, Morita S, Tsuboi K, Matsumura A: Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and internexin as prognostic factors of glial tumors. *J Neurooncol*. 2012 Jul;108(3):361-73. doi: 10.1007/s11060-012-0837-0. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22396072
  17. **Takano S**: Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation. *Brain Tumor Pathol*. 2012 Apr;29(2):73-86. doi: 10.1007/s10014-011-0077-6. Epub 2012 Jan 6. Review. PMID: 22218709
  18. Onuma K, Ishikawa E, Matsuda M, Shibata Y, Satomi K, Yamamoto T, Zaboronok A, **Takano S**, Matsumura A: Navigation-guided endoscopic biopsy for pathological diagnosis for intraparenchymal pure germinoma near the ventricular trigone. *Surg Neurol Int*. 2012;3:9. doi: 10.4103/2152-7806.92177. Epub 2012 Jan 21. PMID: 22347677

〔学会発表〕(計 6件)

1. 杉井成志、**高野晋吾**、山本哲哉、石川栄一、阿久津博義、松田真秀、坂本規影、増本智彦、松村 明: Cnetral neurocytomaの血管新生能. 第32回脳腫瘍病理学会(2014年5月23日、徳島)
2. 木野善弘、**高野晋吾**、坂本則影、石川栄一、山本哲哉、松田真秀、中井 啓、阿久津博義、野口雅之、松村 明: グリア系腫瘍の免疫染色定量評価. 第32回脳腫瘍病理学会(2014年5月23日、徳島)
3. **高野晋吾**、中井 啓、石川栄一、松田真秀、室井 愛、増本智彦、山本哲哉、松村 明: ベバシズマブにより予後改善する膠芽腫. 第73回脳神経外科学会総会(2014年10月10日、東京)
4. **高野晋吾**、阿久津博義、山本哲哉、松田真秀、室井 愛、松村 明: 嚢胞性頭蓋咽頭腫に対する内視鏡手術と定位放射線照射治療の長期成績. 第23回神経内視鏡学会(シンポジウム、2014年11月28日、東京)
5. **高野晋吾**、石川栄一、松田真秀、山本哲哉、松村 明: グリオーマにおける可溶性VEGFレセプター(sFlt-1)の役割. 第32回日本脳腫瘍学会(2014年11月30日、舞浜)
6. **高野晋吾**: 予後マーカー(グリオーマ)、分子脳神経外科学会キーノートレクチャー、第15回日本分子脳神経外科学会(2014年9月26日、山形)

〔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:  
出願年月日:  
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

高野晋吾(TAKAN0 Shingo)  
筑波大学・学内共同利用施設等・病院講師  
研究者番号: 50292553

(2) 研究分担者

上羽哲也(UEBA Tetsuya)  
高知大学・医学部・教授  
研究者番号: 00314203

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: