

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791499

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫幹細胞及びnicheを標的とした新規分子標的治療の試み

研究課題名(英文) Identification of molecular targets for malignant glioma stem cells and stem cell niche.

研究代表者

木嶋 教行(Kijima, Noriyuki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：80534627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は悪性神経膠腫におけるCD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule(ALCAM)の機能的役割についての検討と治療標的分子としての可能性について研究を遂行した。結果ALCAMは悪性神経膠腫において腫瘍血管新生に関与する分子であることを発見し、さらにその作用機序は従来腫瘍血管新生に大きな役割を果たしていると考えられているVEGFとは独立していることを見出した。これらの結果よりALCAMは悪性神経膠腫における腫瘍血管新生をターゲットとした新たな治療標的分子となりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we examined the functional roles of CD166/activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in glioblastoma. We found that ALCAM is involved in glioblastoma angiogenesis through VEGF independent mechanism. Our results suggest that ALCAM could be a new anti-angiogenic agent in glioblastoma.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：グリオーマ幹細胞 幹細胞niche ALCAM

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、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、integrin α 3 を標的とした cilengitide など、分子標的薬剤の開発が行われており、その開発には目覚ましいものがある。

また近年癌幹細胞の概念が提唱され、悪性神経膠腫細胞においても自己複製能、多分化能、腫瘍形成能を有する細胞（悪性神経膠腫幹細胞）が認められており、放射線療法や化学療法に抵抗性であることが示唆されている。つまり悪性神経膠腫に対して治療成績の向上を目指すためには、悪性神経膠腫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。我々はこれまでの研究で悪性神経膠腫幹細胞に特異的に発現している表面分子の候補として CD133 に加え ALCAM が候補となりうることを報告した。ALCAM は種々の癌で発現が報告されており、浸潤や転移、血管新生に関与する分子として知られている。

さらに悪性神経膠腫幹細胞が生体内で生存する niche と呼ばれる微小環境の重要性も指摘されており、niche を target とした治療も悪性神経膠腫治療成績向上のためには重要と考えられている。Nakamura らは造血幹細胞の維持における ALCAM の重要性を報告しており、悪性神経膠腫幹細胞の維持にも ALCAM が関与している可能性が考えられる。悪性神経膠腫幹細胞は腫瘍組織内でも特に perivascular space に存在していることが従来の報告で示唆されており、また

我々は ALCAM は腫瘍血管内皮細胞にも発現していることを確認している。これらのことから血管内皮細胞が ALCAM もしくは sALCAM を介して悪性神経膠腫幹細胞の維持に関与している可能性も考えられる。その機能的役割について検討を行うことは悪性神経膠腫幹細胞 niche を標的とする治療の開発に役立つものと考えられる。

2. 研究の目的

前述のごとく、悪性神経膠腫において ALCAM は腫瘍幹細胞および腫瘍血管内皮細胞の双方に発現が見られており、ALCAM の腫瘍細胞および腫瘍血管内皮での発現が悪性神経膠腫および幹細胞 niche においてどのような意味を持つかについての検討を行うことを目的とした。本研究を行うことで、悪性神経膠腫の難治性の原因とされる悪性神経膠腫幹細胞を標的とした新たな治療標的分子としての可能性を模索し、治療成績の向上に寄与しようというものである。

3. 研究の方法

前述の目的を達成するべく以下の実験を遂行した。

A. 悪性神経膠腫腫瘍血管新生における ALCAM の機能的役割の検討

実験には悪性神経膠腫細胞株（U87MG や U251 など）と血管内皮細胞株である HUVEC を用いた。まずは ALCAM の blocking antibody を血管内皮細胞に添加した際の *in vitro* での tube formation の相違を検討した。次に悪性神経膠腫細胞の control 及び ALCAM knock down の細胞を作成し、*in vivo* での腫瘍血管新生の違いを検討した。さらに悪性神経膠腫細胞の control 及び ALCAM knock down の細胞より上清を採取し、それらを血管内皮細胞に添加した際の *in vitro* での tube

formationの相違も検討した。

C, 悪性神経膠腫幹細胞 niche における ALCAM 及び sALCAM の機能的役割についての検討と 悪性神経膠腫における ALCAM の幹細胞制御及び浸潤、血管新生に関する標的遺伝子の検索

まず我々は悪性神経膠腫摘出標本の免疫染色を行い、幹細胞 niche が存在するとされる腫瘍血管内皮周囲に ALCAM の発現がどの程度見られるのかについての検討を行った。

また cytokine array を用いて ALCAM の幹細胞制御及び浸潤、血管新生に関する標的遺伝子の検索を行った。

4 . 研究成果

ALCAM の blocking antibody を血管内皮細胞 Huvec の培養上清に投与すると in vitro での tube formation を著明に抑制した。またさらに悪性神経膠腫細胞の control 及び ALCAM knock down の細胞より上清を採取し、それらを血管内皮細胞に添加した Huvec の上清に U87MG 及び U251 の ALCAM knock down 株から採取した培養上清は control 細胞から採取した培養上清と比して Huvec の tube formation を抑制した。一方 U87MG ALCAM knock down 株及び control 株を免疫不全マウスへ投与すると、形成された腫瘍内の microvascular density では有意な差は認めなかったが、切片当たりの血管面積及び 1 血管当たりの血管径は ALCAM knock down 株で著明に抑制されていた。また control 細胞と knock down 細胞における VEGF の発現を western blotting、培養上清での cytokine array で検討すると、VEGF の発現には明らかな差は認めなかったが、血管新生に関わる cytokine である interleukin8 の分泌に差が認められた。

本研究およびこれまでの我々の研究より ALCAM は悪性神経膠腫幹細胞成分を濃縮し得る細胞表面抗原であると同時に、腫瘍細胞の浸潤の制御に関与し、また Interleukin8 の分泌の制御を介して VEGF 非依存的に腫瘍血管新生に関わることが示された。

以上のことから ALCAM は悪性神経膠腫幹細胞および腫瘍血管新生を制御する新たな治療標的分子である可能性が示唆された。

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 4 件)

1. Hashimoto N, Tsuboi A, Kagawa N, Chiba Y, Izumoto S, Kinoshita M, Kijima N, Oka Y, Morimoto S, Nakajima H, Morita S, Sakamoto J, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Arita N, Yoshimine T, Sugiyama H.: Wilms tumor 1 peptide vaccination combined with temozolomide against newly diagnosed glioblastoma: safety and impact on immunological response. **Cancer Immunol Immunother.** 2015 Mar 14 [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00262-015-1674-1678. 査読有
2. Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Kinoshita M, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T.: Wilms' tumor 1 is involved in tumorigenicity of glioblastoma by regulating cell proliferation and apoptosis. **Anticancer Res.** 2014 Jan;34 (1):61-67. 査読有
3. 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.** 2012 Oct; 14(10):1254-1264. DOI: 10.1093/neuonc/nor202 査読有
4. Hideyuki Arita, Manabu Kinoshita , Yoshiko Okita , Ryuichi Hirayama , Tadashi Watabe , Kayako Ishohashi, Noriyuki Kijima, Naoki Kagawa , Shimosegawa , Jun Hatazawa, Naoya Hashimoto, Toshiki Yoshimine: Clinical characteristics of meningiomas assessed by 11C-methionine and 18F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography **J Neurooncol** 2012 107(2): 379-386. 査読有 DOI: 10.1007/s11060-011-0759-2
- [学会発表](計 30 件)
1. 香川 尚己:再発髄芽腫に対する治療における分子亜型分類の役
第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会
2014 年 12 月 1 日、千葉
 2. 香川 尚己:髄芽腫の再発予測と治療戦略における分子亜型分類の意義
第 73 回日本脳神経外科学会学術総会
2014 年 10 月 10 日、東京
 3. Naoya Hashimoto : WT1 peptide vaccination for malignant gliomas as a part of multi-modal therapy.
ICBTRT2014-20th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy
2014 年 7 月 22 日、California, USA
 4. Naoki Kagawa : Retrospective analysis of recurrent patterns and clinical outcome by reduced-dose irradiation plus adjuvant chemotherapy in molecular subgrouping of medulloblastomas.
ISPNO 2014 - 16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology
2014 年 6 月 30 日、Singapore, Singapore
 5. Naoki Kagawa : Dynamical volumetric changes of primary intracranial germinomas before chemoradiotherapy
ISPNO 2014 - 16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology
2014 年 6 月 30 日、Singapore, Singapore
 6. 高野 浩司 : Spontaneous malignant transformation を来した成人 pilocytic astrocytoma の 2 例
第 32 回日本脳腫瘍病理学会
2014 年 5 月 24 日、徳島
 7. Noriyuki Kijima : Characterization of Medulloblastoma Xenografts as Models of Leptomeningeal Dissemination.
5th Terry fox research institute annual scientific meeting
2014 年 5 月 8 日、Montreal, Canada
 8. 木嶋教行 : 脳腫瘍幹細胞研究と免疫療法 (悪性脳腫瘍の克服に向けて)
TLSC(Toronto Life Science Club) 勉強会記念講演
2014 年 3 月 28 日、Toronto, Canada
 9. Noriyuki Kijima : CD166/ALCAM is expressed in glioblastoma endothelial cells and is involved in the regulation of glioblastoma angiogenesis through the regulation of interleukin 8.
SNO 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology
2013 年 11 月 22 日、San Francisco, USA
 10. 香川 尚己 : 神経膠芽腫における CD166 発現と subventricular zone との関係-再発形式と予後への影響
第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会
2013 年 12 月 9 日、宮崎
 11. Naoya Hashimoto : WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide.

- 15th WFNS World Congress of Neurosurgery (WFNS2013)
2013年9月12日、Seoul, Korea
12. 木嶋教行 : 当院における海綿状血管腫の無症候性経過観察例と症候性出血例についての検討
Stroke 2013 第38回日本脳卒中学会学術集会 2013年3月21日、東京
13. Naoya Hashimoto : WT1 peptide vaccination for malignant gliomas; basic findings and clinical trials.
The 4th Joint Neurosurgical Convention (4th JNC)
2013 2013年2月1日、Hawaii, USA
14. 木嶋教行 : 悪性神経膠腫におけるCD166/Activated leukocyte cell adhesion molecule の発現と腫瘍血管新生における機能的役割
第30回日本脳腫瘍学会学術集会 2012年11月25日、広島
15. Noriyuki Kijima : The effect of WT1 on tumorigenicity and apoptosis in glioblastoma.
The 6th International Conference on WT1 In Human Neoplasia
2012年11月23日 Kyoto, Japan
16. Naoya Hashimoto : WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide.
The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia
2012年11月23日、Kyoto, Japan
17. Yasuyoshi Chiba : Tumor-infiltrating lymphocytes and immune escape in patients with malignant glioma receiving WT1 peptide vaccination.
The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia
2012年11月23日、Kyoto, Japan
18. Noriyuki Kijima : The effect of WT1 on tumorigenicity, cell proliferation and apoptosis in glioblastoma
SNO 17th Annual Scientific Meeting
2012年11月17日、Washington DC, USA
19. Naoya Hashimoto : WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with temozolomide
SNO 17th Annual Scientific Meeting
2012年11月17日、Washington DC, USA
20. Naoki Kagawa: High expression of activated leukocyte cell adhesion molecule correlates with perigentricular origin and diffuse invasive recurrence in malignant gliomas.
SNO 17th Annual Scientific Meeting
2012年11月17日、Washington DC, USA
21. Yasuyoshi Chiba: Tumor-infiltrating lymphocytes and immune escape in human malignant gliomas after WT1 vaccination.
SNO 17th Annual Scientific Meeting
2012年11月17日、Washington DC, USA
22. 木嶋教行 : 当院における海綿状血管腫の無症候性経過観察例と症候性出血例についての検討
第71回日本脳神経外科学会学術集会 2012年10月17日、大阪
23. 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13回日本分子脳神経外科学会 学会賞受賞記念講演
2012年9月21日、熊本
24. 橋本 直哉 : 膠芽腫における WT1 遺伝子産物の機能的役割
第13回日本分子脳神経外科学会
2012年9月20日、札幌
25. Naoki Kagawa: Expression of activated

leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) influences prognosis in malignant glioma

第 20 回日本癌学会学術集会

2012 年 9 月 20 日、札幌

26. 木嶋 教行 : The effect of WT1 on tumorigenicity and apoptosis in glioblastoma. グリオブラストーマにおける WT1 (Wilms' tumor 1) の機能的役割.

第 20 回日本癌学会学術集会

2012 年 9 月 19 日、札幌

27. 坪井 昭博 : 初発悪性神経膠腫を対象としたテモゾロミド併用 WT1 ペプチドワクチン第 相臨床試験
第 20 回日本癌学会学術集会
2012 年 9 月 19 日、札幌

28. Naoki Kagawa : Skull base meningiomas grow slower compared to non-skull base ones based on volumetric and biological studies.

15th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology

2012 年 6 月 26 日、Toronto, Canada

29. Naoki Kagawa : Spontaneous regression of primary intracranial germinomas: Clinical outcomes and histopathological findings. 15th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology

2012 年 6 月 25 日、Toronto, Canada

30. Naoya Hashimoto : WT1 peptide vaccination for malignant gliomas as a part of multi-modal therapy.

The 9th meeting of Asian Society for Neuro-Oncology

2012 年 4 月 21 日、Taipei, Taiwan

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

木嶋 教行 (KIJIMA Noriyuki)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号 : 80534627

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)