

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462261

研究課題名(和文) 悪性グリオーマにおける血管新生 - 浸潤シフトの分子生物学的機構の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of invasion and angiogenesis of malignant glioma

研究代表者

市川 智継 (ICHIKAWA, Tomotsugu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10362964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマの血管新生能と浸潤能を規定するkey moleculeであるannexin A2の発現をコントロールし、その下流で動く遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、血管新生非依存性浸潤を規定する遺伝子の候補としてFGF13を抽出し、動物モデルを用いて浸潤と血管新生における機能を検証した。FGF13は細胞骨格を制御することにより浸潤能に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate angiogenesis and invasion of malignant glioma, we conducted microarray analysis of our original glioma models. As a result, we found FGF13 as a candidate molecule for angiogenesis-independent invasion. Also, we analyzed molecular function of FGF13 by using our glioma models. FGF13 might contribute to angiogenesis-independent invasion by controlling cellular cytoskeleton.

研究分野：医歯薬学、外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学 血管新生 浸潤シフト グリオーマ 浸潤 血管新生

## 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統合的な研究がなされていないことにある。

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と血管新生能の解析研究を行ってきたが、浸潤にはふたつの様式が存在し、血管新生とも密に関連していることを示した。浸潤様式のひとつは「**血管新生依存性浸潤**」で、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血管周囲に浸潤する。もうひとつは「**血管新生非依存性浸潤**」で、腫瘍細胞は、血管新生を伴うことなく、個々に正常脳組織の中へと浸潤する。我々は、これらの浸潤様式を個別に模倣する動物グリオーマモデルを確立している。

さらに、血管新生依存性浸潤を示す腫瘍細胞では、**annexin A2** を高発現しており、この遺伝子発現が、浸潤パターン規定に大きく関与していることを突き止めている。近年、グリオーマの血管新生に様々な因子が関与していることが解明され、なかでも VEGF は治療標的として注目されている。ところが抗 VEGF 抗体療法は、血管新生を抑制した後にグリオーマ細胞のびまん性の浸潤を誘発し、腫瘍が治療抵抗性になるという現象が報告されている。このような現象は「**血管新生 - 浸潤シフト**」と呼ばれ、我々のモデルを用いて説明すると、血管新生依存性浸潤が抑制された結果、血管新生非依存性浸潤が促進されていると考えられる。この現象について分子レベルでの機序は解明されていない。我々は、血管新生依存性浸潤を規定する遺伝子 **annexin A2** をブロックすることにより血管新生非依存性浸潤が誘導されること、また逆に、血管新生非依存性浸潤細胞に **annexin A2** を導入すると血管新生依存性浸潤型に変化することを組織学的に確認している。すなわち、**annexin A2** は、「血管新生 - 浸潤シフト」に関与する key molecule のひとつであると考えられる。

## 2. 研究の目的

浸潤性悪性グリオーマ動物モデルを用いて、「血管新生 - 浸潤シフト」の原因となる血管新生非依存性浸潤規定遺伝子 X を同定し、グリオーマの本質的な病態である浸潤と血管新生のメカニズムを解明する。本研究の特色と独創的な点は、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て、我々が同定した「血管新生 - 浸潤シフト」規定遺伝子 X のひとつであ

る **annexin A2** に着目し、分子生物学的な解析に加え、時間的、空間的ダイナミックな解析を行うことである。悪性グリオーマの増殖と浸潤、血管新生は密接な関係にあり切り離して考えることはできないが、このモデルを用いることによって、既存の動物モデルでは再現不可能であった浸潤も含めて、悪性グリオーマの本質に迫ることができる。本研究は、現在の治療法の限界を克服し悪性グリオーマを根治へと導く新規治療法の開発に不可欠である。

## 3. 研究の方法

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と、分子生物学的な解析を行った。まず、「血管新生 - 浸潤シフト」の key molecule である **annexin A2** の発現をコントロールした場合に、その下流で動く遺伝子・タンパクは何かをマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析した。つぎに、見出された因子の中から、「血管新生 - 浸潤シフト」すなわち血管新生非依存性浸潤を規定する遺伝子の候補を抽出した。そして、えられた候補遺伝子 X (複数の可能性もある) について、動物モデルを用いて浸潤と血管新生における機能を検証した。また、ヒト悪性グリオーマ標本を用いて、候補遺伝子 X の発現と臨床的、組織学的特徴について検証を行った。

## 4. 研究成果

マイクロアレイ法による血管新生非依存性浸潤規定遺伝子 X の候補抽出

血管新生依存性浸潤型 J3T-1 グリオーマ細胞とその **annexin A2** 遺伝子ノックアウト細胞 (J3T-1shA)、血管新生非依存性浸潤型 J3T-2 グリオーマ細胞とその **annexin A2** 遺伝子導入細胞 (J3T-2A) から、カラム精製により purity の高い total RNA を抽出した。これら 4 つの検体をもって、マイクロアレイの受託解析をおこなった。解析結果より、J3T-1 と J3T-1shA の組み合わせ、J3T-2 と J3T-2A の組み合わせで発現の比較を行い、遺伝子発現を操作した細胞で発現が上昇した遺伝子と低下した遺伝子を抽出した。ふたつの比較結果を検討して、血管新生非依存性浸潤に関与する遺伝子 X の候補として、**FGF13** を抽出した。

J3T モデルおよび複数のヒトグリオーマ細胞株 (U87 EGFR、U373、A172) における **FGF13** の発現量を比較した。**FGF13** は J3T-2 において J3T-1 の約 14 倍高く発現していた。**FGF13** には 2 種類の transcript variant が存在し、グリオーマでは特に細胞質に発現する variant (**FGF13B**) が高発現していることを確認した。また、正常 astrocyte での **FGF13B** 発現レベルは低く、グリオーマ細胞に特異的に発現していると考えられた。さらに、**FGF13** を overexpression もしくは knockdown することで in vitro で浸潤能の変化を評価した。

J3T-2 および、normal human astrocyte より FGF13 の発現が高い U87 EGFR、U373 細胞株では、siRNA を用いて knockdown することで有意に浸潤能の低下を認めた。一方、FGF13 の発現の低い A172 細胞株で overexpression すると浸潤能が上昇する傾向があった。免疫染色により細胞株およびヒトグリオーマ組織における FGF13 と細胞骨格との関連を評価した。FGF13 は腫瘍細胞の核および細胞質に発現しており、細胞質では特に細胞骨格との共局在が確認された。以上より、FGF13 は細胞質におけるチューブリン重合を介してグリオーマ細胞の浸潤を制御していると考えられ、グリオーマの血管新生 - 浸潤シフトに関与する可能性が示唆された。FGF13B に対する治療は、グリオーマ細胞特異性が高く、新たな治療候補となる可能性が高いと想定される。

#### 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 18 件)

1. Hybrid microscopic-endoscopic surgery for craniopharyngioma in neurosurgical suite: technical report. Ichikawa T, Otani Y, Ishida J, Fujii K, Kurozumi K, Ono S, Date I. doi: 10.1016/j.wneu.2015.08.058. World Neurosurg 85: 340-348, 2016 査読有
2. Evaluation of extracellular matrix protein CCN1 as a prognostic factor for glioblastoma. Ishida J, Kurozumi K, Ichikawa T, Otani Y, Onishi M, Fujii K, Shimazu Y, Oka T, Shimizu T, Date I. Brain Tumor Pathol. 2015 Oct;32(4):245-52. doi: 10.1007/s10014-015-0227-3. Epub 2015 Jul 23. PMID:26201842 査読有
3. Integrin antagonist augments the therapeutic effect of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy for malignant glioma. Shimazu Y, Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Onishi M, Ishida J, Oka T, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Date I. Gene Ther. 2015 Feb;22(2):146-54. doi: 10.1038/gt.2014.100. Epub 2014 Nov 13. 査読有
4. Annexin A2 regulates angiogenesis and invasion phenotypes of malignant glioma Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Inoue S, Maruo T, Otani Y, Fujii K, Ishida J, Shimazu Y, Yoshida K, Michiue H, Chiocca EA, Date I Brain Tumor Pathol. 2015 Jul; 32(3):184-94. doi: 10.1007/s10014-015-0216-6. Epub 2015 Feb 20 査読有
5. A patient develops transient unique cerebral and cerebellar lesions after unruptured aneurysm coiling. Deguchi K, Kawahara Y, Deguchi S, Morimoto N, Kurata T, Ikeda Y, Ichikawa T, Tokunaga K, Kawai N, Sugi K, Abe K. BMC Neurol. 2015 Mar 31;15:49. doi: 10.1186/s12883-015-0303-7. PMID:25884179 Free PMC Article 査読有
6. Reduced neurotoxicity with combined treatment of high-dose methotrexate, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone (M-CHOP) and deferred radiotherapy for primary central nervous system lymphoma Ichikawa T, Kurozumi K, Michiue H, Ishida J, Maeda Y, Kondo E, Kawasaki A, Date I. Clin Neurol Neurosurg. 2014 Dec;127:106-11. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.10.011. Epub 2014 Oct 22. PMID:25459253 査読有
7. Integrin Inhibitor Suppresses Bevacizumab-Induced Glioma Invasion. Ishida J, Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Shimazu Y, Oka T, Date I. Transl Oncol. 2014 Mar 4. pii: S1936-5233(14)00017-5. doi: 10.1016/j.tranon.2014.02.016. Translational Oncology 7(2): 292-302, 2014 査読有
8. Fatal glioblastoma after gamma knife radiosurgery for arteriovenous malformation in a child Yoshida K, Ichikawa T, Kurozumi K, Yanai H, Onoda K, Date I Journal of Clinical Neuroscience : dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2013.10.039, 2014 査読有
9. 頭蓋底悪性腫瘍摘出術における脳神経外科の役割 安原隆雄、黒住和彦、市川智継、小野成紀、小野田友男、江口元治、山田 潔、木股敬裕、伊達 勲 脳神経外科速報 24(6): 670-677, 2014 査読有
10. 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 doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01344.x. Neuro pathology 33(2): 162-174, 2013 査読有
11. Gene expression profiling of the anti-glioma effect of cilengitide Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Michiue H, Fujii K, Ishida J, Shimazu

Y, Chiocca EA, Kaur B, Date I  
Springer Plus 2:160:  
doi:10.1186/2193-1801-2-160, 2013 査  
読有

12. Proteomics-based analysis of invasion-related proteins in malignant gliomas 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 *Neuropathology* 33(3): 264-275, 2013 doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01361.x. 査読有
13. The integrin inhibitor cilengitide enhances the anti-glioma efficacy of vasculostatin-expressing oncolytic virus Fujii K, Kurozumi K, Ichikawa T, Onishi M, Shimazu Y, Ishida J, Chiocca EA, Kaur B, Date I *Cancer Gene Therapy* 20(8): 437-444, 2013 doi: 10.1038/cgt.2013.38. 査読有
14. Mecanisms of tumor development and anti-angiogenic therapy in glioblastoma multiforme Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Date I *Neurologia medico-chirurgica* 53(11): 755-763, 2013 PMID:24162241 Free PMC Article 査読有
15. 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
16. 脳幹部海綿状血管腫に対する直達手術9例の検討 黒住和彦、小野成紀、市川智継、三好康之、石田穰治、春間 純、徳永浩司、伊達 勲 *脳卒中の外科* 41(3): 213-218, 2013 査読有
17. 小児テント上悪性星細胞腫における分子生物学的検討 血管新生因子 cystein rich protein 61 (CYR61) に着目して 石田穰治、黒住和彦、市川智継、大西 学、伊達 勲 *小児の脳神経* 38(2): 220-226, 2013 査読有
18. グリオーマの分子標的薬 Bevacizumab と Cilengitide 黒住和彦、大西 学、市川智継、藤井謙太郎、石田穰治、島津洋介、伊達 勲 *癌と化学療法* 40(6): 718-722, 2013 査読有

〔学会発表〕(計 27件)

1. 第25回脳神経外科手術と機器学会、朱鷺メッセ(新潟), 2016.03.26, 頭蓋底腫瘍に対する顕微鏡-内視鏡ハイブリッド手術 2画面同時観察テクニックのエルゴノミクス(シンポジウム), 市川智継、大谷理浩、石田穰治、黒住和彦、亀田雅博、伊達 勲
2. 第26回日本間脳下垂体腫瘍学会、(セレ

クトン福島)福島, 2016.02.19, 頭蓋咽頭腫に対する顕微鏡-内視鏡ハイブリッド手術による低侵襲手術(シンポジウム), 市川智継、大谷理浩、石田穰治、亀田雅博、黒住和彦、小野成紀、伊達 勲

3. 第39回日本脳神経CI学会総会, 日経ホール&カンファレンスルーム(東京), 2016.01.29, テント上異所性上衣腫の臨床象と画像所見, 市川智継、木谷尚哉、大谷理浩、黒住和彦、石田穰治、小野成紀、伊達 勲
4. 第45回岡山県病院薬剤師会 がん薬物療法研究会, 岡山コンベンションセンター(岡山), 2016.01.16, 脳腫瘍治療における手術と化学療法の位置づけ, 市川智継
5. Meet the Expert in 岩国, 岩国医療センター(岩国), 2015.12.09, グリオーマ治療の現状と展望(特別講演), 市川智継
6. 第2回 TSC ROUND TABLE MEETING in AICHI, ウエスティン名古屋キャッスルホテル(名古屋), 2015.11.30, SEGA に対する治療戦略 エベロリムスはパラダイムシフトをもたらすか(特別講演), 市川智継
7. 第33回日本脳腫瘍学会学術集会, グランドプリンスホテル京都(京都), 2015.12.08, 中枢神経原発リンパ腫に対する寛解導入後の地固め療法 3つのレジメンの比較, 市川智継、近藤英生、黒住和彦、大谷理浩、石田穰治、島津洋介、岡 哲生、清水俊彦、冨田祐介、松本悠司、前田嘉信、伊達 勲
8. (一社)日本脳神経外科学会第74回学術総会, ロイトン札幌(札幌), 2015.10.16, 中枢神経原発リンパ腫に対する初期寛解導入療法の成績から見えてきた課題と次の治療戦略(シンポジウム), 市川智継、黒住和彦、道上宏之、石田穰治、島津洋介、岡 哲生、大谷理浩、清水俊彦、冨田祐介、伊達 勲
9. 第1回日本アネキシン研究会, 東京大学農学部(東京), 2015.10.11, 悪性グリオーマの浸潤能と血管新生能を規定する annexin A2 の分子生物学的解析, 市川智継、丸尾智子、井上 智、大西 学、石田穰治、大谷理浩、黒住和彦、伊達 勲
10. 第20回日本脳腫瘍の外科学会, 名古屋観光ホテル(名古屋), 2015.09.26, マルチモダリティ脳腫瘍手術を支える周術期画像情報管理システム, 市川智継、黒住和彦、亀田雅博、伊達 勲
11. 第16回日本分子脳神経外科学会, アクティシティ浜松コンgresセンター(浜松), 2015.08.28, グリオーマ浸潤細胞を標的とする治療法(イブニングセミナー), 市川智継
12. 第55回日本リンパ網内系学会総会, 岡山コンベンションセンター(岡山),

- 2015.07.10, 中枢神経原発リンパ腫に対する非照射治療を目指した移植併用超大量化学療法, 市川智継、近藤英生、黒住和彦、大谷理浩、前田嘉信、吉野 正、谷本光音、伊達 勲
13. 第43回西播磨脳神経懇話会, ホテル日航姫路(姫路), 2015.06.24, マルチモダリティを駆使した脳腫瘍の診断と治療(特別講演), 市川智継
14. 第15回日本術中画像情報学会, 東京サイエンスセンター(川崎) 2015.06.20, マルチモダリティ脳神経外科手術のための周術期画像情報管理システム, 市川智継、黒住和彦、亀田雅博、伊達 勲
15. 第33回日本脳腫瘍病理学会, JR ホテルクレメント高松(高松), 2015.05.29, BCNU Wafer の作用機序 画像と病理から読み解く (ランチョンセミナー), 市川智継
16. 第24回脳神経外科手術と機器学会, コングレコンベンションセンター(大阪), 2015.04.03, 脳神経外科マルチモダリティ活用のための周術期画像情報管理システム(シンポジウム), 市川智継、黒住和彦、亀田雅博、伊達 勲
17. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会, シェラトンブランドトーキョーベイホテル(浦安), 2014.12.01, 中枢神経原発リンパ腫の未照射再発に対する salvage 化学療法の有効性, 市川智継、黒住和彦、大谷理浩、石田穰治、島津洋介、岡 哲生、清水俊彦、富田祐介、村井 智、伊達 勲
18. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山コンベンションセンター(岡山), 2014.11.28, High survival rate in pediatric medulloblastoma with postoperative combined chemotherapy and reduced craniospinal radiotherapy (English Session), Ichikawa T, Shimizu T, Kurozumi K, Otani Y, Shimada A, Washio K, Nishiuchi R, Oda M, Katsui K, Yanai H, Date I
19. (一社)日本脳神経外科学会第73回学術総会, グランドプリンスホテル新高輪(東京), 2014.10.09, 脳神経外科 SUITE における頭蓋咽頭腫に対する顕微鏡・内視鏡ハイブリッド手術, 市川智継、黒住和彦、石田穰治、亀田雅博、小野成紀、伊達 勲
20. 11th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, Istanbul, Turkey, 2014.09.11, High response rate to methotrexate-based multiagent chemotherapy (M-CHOP) for primary central nervous system lymphoma, Ichikawa T, Kurozumi K, Michiue H, Ishida J, Shimazu Y, Oka T, Otani Y, Shimizu T, Maeda Y, Kondo E, Kawasaki A, Date I
21. 第42回日本小児神経外科学会, 江陽グラ  
ンドホテル(仙台), 2014.05.29, 小児の中枢神経系 histiocytic tumor の臨床病態, 市川智継、馬越通有、黒住和彦、藤井謙太郎、嶋田 明、柳井広之、伊達 勲
22. 第29回悪性リンパ腫治療研究会, ホテル金沢(金沢), 2014.04.20, 中枢神経原発リンパ腫の診断と治療(シンポジウム), 市川智継、黒住和彦、近藤英生、前田嘉信、伊達 勲
23. 第23回脳神経外科手術と機器学会, ヒルトン福岡シーホーク(福岡), 2014.04.18, 脳腫瘍手術におけるバイポーラ 撮子の使い分け (シンポジウム), 市川智継、黒住和彦、伊達 勲
24. 第31回日本脳腫瘍学会学術集会: フェニックス・シーガイアリゾート(宮崎), 2013.12.08 中枢神経原発リンパ腫に対する超大量化学療法の治療成績アップデート 市川智継、黒住和彦、近藤英生、藤井謙太郎、石田穰治、高橋 悠、馬越通有、畝田篤仁、島津洋介、岡 哲生、前田嘉信、伊達 勲
25. 18th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology: San Francisco, U.S.A., 2013.11.22 Annexin A2 regulates angiogenesis and invasion phenotypes of malignant glioma Ichikawa T, Onishi M, Kurozumi K, Maruo T, Fujii K, Ishida J, Shimazu Y, Oka T, Chiocca EA, Date I
26. (一社)日本脳神経外科学会第72回学術総会: パシフィコ(横浜)横浜, 2013.10.17 中枢神経原発リンパ腫に対する非照射治療を目指した超大量化学療法(シンポジウム) 市川智継、黒住和彦、藤井謙太郎、石田穰治、馬越通有、畝田篤仁、近藤英生、前田嘉信、伊達 勲
27. 第18回日本脳腫瘍の外科学会: 大津プリンスホテル(大津), 2013.09.19 頭蓋咽頭腫に対する顕微鏡下摘出術における内視鏡支援の有用性 市川智継、黒住和彦、小野成紀、石田穰治、高橋 悠、馬越通有、伊達 勲

〔図書〕  
該当なし

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

市川 智継 (CHIKAWA, Tomotsugu)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授  
研究者番号: 10362964

(2)研究分担者

黒住 和彦 (KUROZUMI, Kazuhiko)  
岡山大学・大学病院・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

安原 隆雄 (YASUHARA, Takao)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
講師  
研究者番号：50457214

亀田 雅博 (KAMEDA, Masahiro)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：50586427

以上