

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462180

研究課題名(和文) 悪性グリオーマ幹細胞におけるWT1とALCAMの機能的役割と血管新生への関与

研究課題名(英文) Functional role and contribution to angiogenesis of WT1 /ALCAM molecules in glioma stem cell

研究代表者

橋本 直哉 (Hashimoto, Naoya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90315945

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)：悪性グリオーマ幹細胞と悪性グリオーマ細胞においてALCAM(Activated leukocyte cell adhesion molecule)とWT1(Wilms' Tumor 1)の機能的役割と血管新生との関連について実験的検討を行った。WT1分子は腫瘍形成能に重要な役割を果たし、ALCAM分子とともに腫瘍血管新生に必須であることを明らかにした。合わせて、分泌型のsALCAM分子の役割についても血管新生と腫瘍浸潤能に一定の関与があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Through a series of experimental procedure on ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule) and WT1 (Wilms' Tumor 1) molecules using glioma stem cell and glioma cell, we found that WT1 plays an important role for tumor formation capability in those cells, and that both molecules are essential for tumor angiogenesis. Also, we revealed that sALCAM (soluble ALCAM) could relate to tumor-angiogenesis and tumor invasion ability.

研究分野：脳腫瘍治療学

キーワード：ALCAM/sALCAM WT1 glioma stem cell tumor formation angiogenesis tumor invasion

1. 研究開始当初の背景

正常脳における Neuro-vascular unit の概念と共に、脳腫瘍においても血管新生や perivascular niche が重要な役割を果たすことが明らかになってきていた。私どもがグリオーマ細胞の発生、増殖に重要と報告した WT1(Wilms' Tumor 1)遺伝子産物と ALCAM(Activated leukocyte cell adhesion molecule)分子は、その双方が血管新生にも深く関わっていることが実験結果より予想されたため、これら2つの分子が、脳腫瘍における perivascular niche という微小環境で、どのような機能的役割を担い、血管新生へどのように関与するかを明らかにすべきと考えた。

2. 研究の目的

- (1) 悪性グリオーマ幹細胞における WT1 遺伝子産物の機能的役割を解明し、その際には網羅的な遺伝子解析を行い、幹細胞の維持に関わる signal pathway を明らかにする。
- (2) 悪性グリオーマ血管新生における ALCAM (sALCAM)と WT1 の機能的役割を解明する。
- (3) 悪性グリオーマ幹細胞の perivascular niche における ALCAM (sALCAM)と WT1 の機能的役割の解明：悪性グリオーマ幹細胞と血管内皮細胞との相互作用について検討し、その役割を解明する。
- (4) ALCAM の分泌型である sALCAM に対する blocking antibody の作成とその効果の検討：本分子が脳腫瘍治療の標的になりうるかどうかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 悪性グリオーマ幹細胞における WT1 遺伝子産物の機能的役割の検討：Tumor sphere を形成する初期培養腫瘍細胞にて WT1 を knock down し、in vitro での分化能の相違を検討し、免疫不全マウスに移植した際の腫瘍形成能の相違を検討した。さらに WT1 knock down sphere の網羅的な遺伝

子解析を行い、幹細胞の維持に関わる signal pathway を明らかにすべく、実験を行った。

(2) 悪性グリオーマ血管新生における ALCAM (sALCAM)と WT1 の機能的役割の解明：In vitro における tube formation assay や in vivo での腫瘍血管内皮細胞の相違を検討し、ALCAM (sALCAM)と WT1 の腫瘍血管新生における役割を検討した。

(3) 悪性グリオーマ幹細胞の perivascular niche における ALCAM (sALCAM)と WT1 の機能的役割の解明：悪性グリオーマ幹細胞と血管内皮細胞との相互作用について、CD133(+)/ALCAM(+)/WT1(+) もしくは WT1(-)の腫瘍細胞を、血管内皮細胞と共培養し、血管内皮細胞の tube formation の違いを検討した。血管内皮細胞の WT1 および ALCAM knock down 細胞を腫瘍細胞と共培養し、tumor sphere 形成能と分化能の違いを検討、perivascular niche における血管内皮細胞と幹細胞のクロストーク、幹細胞の維持に果たす役割を検討した。

(4) sALCAM に対する blocking antibody の作成とその効果の検討：sALCAM の blocking antibody を作成し、本分子が治療の標的になりうることを示す。

4. 研究成果

ALCAM と WT1 を基軸として、グリオーマ幹細胞 / グリオーマ細胞における機能的役割や血管新生との関連を明らかにし、新たな治療法を開発することを目的に、研究計画書に基づき以下の研究を行い、以下の成果を得た。

(1) 悪性グリオーマ幹細胞における WT1 遺伝子産物の機能的役割の検討：臨床検体における初期培養腫瘍細胞から tumor sphere を作成し、WT1 を knock down し、in vitro での分化能の相違を検討した。その結果、WT1 遺伝子産物はグリオーマ幹細胞において、その増殖能に不可欠な役割を担って

いた。また、免疫不全マウスにこれらの細胞を移植した時の腫瘍形成能を検討したところ、WT1 を knock down した細胞では、腫瘍形成能が著しく低下し、腫瘍の形成に重要な役割を担うことが示唆された。網羅的遺伝子解析は現在も遂行中であるが、いくつかの遺伝子がこれらの pathway に関わっている可能性が浮上し、確認作業を遂行中である。

(2) 悪性グリオーマ血管新生における WT1 と ALCAM / sALCAM の機能的役割の解明： In vitro での tube formation assay と in vivo での腫瘍血管内皮細胞の形態学的検討を行い、これら 2 つの分子は腫瘍血管新生にも重要な役割を担っている結果が得られた。

(3) 悪性グリオーマ幹細胞の perivascular niche における WT1 と ALCAM の機能的役割の解明： CD133(+)/ALCAM(+)/WT1(+) と WT1(-) の腫瘍細胞を、血管内皮細胞と共培養し、tube formation の違いを検討した。WT1 も腫瘍血管新生に重要な役割を担うことが判明した。In vivo で、腫瘍細胞を①単独群、②+ control の血管内皮細胞投与群、③+ ALCAM knock down 血管内皮細胞投与群、④+ WT1 knock down 血管内皮細胞投与群に分けて免疫不全マウスに投与し、検討したところ、③④では著しく腫瘍形成能が低下し、これは血管新生能にこれらの分子が大きく関わり、結果として腫瘍形成能に影響したものと考えられた。

(4) sALCAM に対する blocking antibody の作成とその効果の検討：sALCAM に対する抗体の作成を、ハイブリドーマによる抗体精製法を用いて開始したが、今のところよい抗体を得るまでには至っておらず、引き続き作成実験を継続する予定である。

これら(1)から(4)を総括すると、悪性グリオーマ幹細胞における(1)WT1 遺伝子産物の機能的役割の検討、(2)悪性グリオーマ血管

新生における WT1 と ALCAM / sALCAM の機能的役割の解明、(3)悪性グリオーマ幹細胞の perivascular niche における WT1 と ALCAM の機能的役割の解明、ではあらかじめ予測された一定の成果を得たものと考えられる。しかしながら、それら 2 つの分子の相互作用や正確な signal pathway や分子機序の解明にはいたっておらず、さらなる検討を行うべく、新たな実験系を計画中である。(4) sALCAM に対する blocking antibody の作成とその効果の検討においては、あらかじめ予測された一定の成果を得られなかったが、問題点は明らかになっており、今後の研究に役立つものとする。

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 7 件)

1. Thompson EM, Hielscher T, Bouffet E, Remke M, Luu B, Gururangan S, Hashimoto N, Ramaswamy V, Taylor MD, et al., Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol.* 2016. Mar11. Epub ahead. 査読無
2. Hashimoto N, Tsuboi A, Kagawa K, Chiba Y, Izumoto S, Kinoshita M, Kijima N, Oka Y, Morimoto S, Nakajima H, Morita S, Sakamoto J, Nishida S, Hoson 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. 査読有
3. Hino A, Oka H, Hashimoto Y, Echigo T, Koseki H, Fujii A, Katsumori T, Shiomi N, Nozaki K, Arima H, Hashimoto N. Direct microsurgical embolectomy for acute occlusion of the internal carotid artery and middle cerebral artery. *World Neurosurg.* 2016. 88. 243-251. 査読無
4. Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2015. 査読有

5. Okada H, Weller M, Huang R, Finocchiaro G, Gilbert MR, Wick W, Ellingson BM, Hashimoto N, Pollack IF, Brandes AA, Franceschi E, Herold-Mende C, Nayak L, Panigrahy A, Pope WB, Prins R, Sampson JH, Wen PY, Reardon DA. Immunotherapy response assessment in neuro-oncology: a report of the RANO Working group. *Lancet Oncol.* 2015. 16. e534-42. 査読有
6. Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Kinoshita M, Sugiyama H, Yoshimine T. Wilm's Tumor 1 Is Involved in Tumorigenicity of Glioblastoma by Regulating Cell Proliferation and Apoptosis. *ANTICANCER RESEARCH.* 2014. 34. 61-67. 査読有
7. Kinoshita M, Sasayama T, Narita Y, Yamashita F, Kawaguchi A, Chiba Y, Kagawa N, Tanaka K, Kohmura E, Arita H, Okita Y, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Hashimoto N, Yoshimine T. Different spatial distribution between germinal center B and non-germinal center B primary central nervous system lymphoma revealed by magnetic resonance group analysis. *Neuro Oncol.* 2014. 16. 728-734. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Hashimoto N. Immunotherapy with WT1 peptide for gliomas, BIOMARKERS and response assessment. The 13th Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) Meeting / 9th CONGNO Annual Scientific Meeting (国際学会) 2016年9月13日. シドニー (オーストラリア)
2. Naoya Hashimoto, Akihito Tsuboi, Toshiki Yoshimine, Haruo Sugiyama. WT1 peptide vaccination for glioblastomas; survivals, biomarkers, and response assessment. ICBTRT 2016 (国際学会). 2016年4月11日. 万国津梁館 (沖縄県名護市).
3. 橋本直哉 神経膠腫に対するWT1ペプチドワクチン療法の新展開. 第74回日本脳神経外科学会総会. 2015年10月14日~2015年10月16日. ロイトンホテル札幌 (北海道札幌市)
4. 橋本直哉 悪性神経膠腫に対するテモドロミド併用のWT1ペプチド免疫療法とimmuno RANO 第18回WT1ペプチド癌免疫療法研究 2015年3月31日 大阪大学医学部 (大阪府吹田市)
5. 橋本直哉 脳腫瘍画像の基本とそこから見えるもの 診療放射線技師画像解析セミナー (HITの会) 2015年2月28日. 島津製作所マルチホール (大阪府大阪市)

6. 橋本直哉 膠芽腫手術におけるナビゲーションと5-ALAの摘出率への寄与について 第38回日本脳神経CI学会 2015年2月15日 ウィンクあいち (愛知県古屋市)
7. 橋本直哉 悪性グリオーマに対するWT1 CLT ペプチドとヘルパーペプチドを併用した免疫療法 第32回日本脳腫瘍学会学術集会 2014年11月30日 シェラトン・トーキョーベイ・ホテル (千葉県浦安市)
8. 橋本直哉 国内におけるグリオーマの分子遺伝学的診断の実態について 第32回日本脳腫瘍学会学術集会 2014年11月3日 シェラトン・トーキョーベイ・ホテル (千葉県浦安市)
9. 橋本直哉 悪性脳腫瘍に対する免疫療法と核医学 第54回日本核医学学術総会 2014年11月8日 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
10. 橋本直哉 グリオーマのWT1ペプチドワクチン療法; テモドロミド併用の効果、バイオマーカーと免疫学的応答 日本脳神経外科学学会 第73回学術総会 2014年10月9日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)
11. 橋本直哉 画像/蛍光誘導手術から見えるもの 第19回日本脳腫瘍の外科学会 2014年9月12日 東京ドームホテル (東京都文京区)
12. 橋本直哉 悪性脳腫瘍に対する免疫療法の現状と展望 大分脳腫瘍研究会 2014年5月9日. レンブラントホテル大分 (大分県大分市)
13. Hashimoto Naoya RESPONSEASSESSMENTS IN WT1 PEPTIDE VACCINATION AND LONG TERM RESULTS OF COMBINED THERAPY. THE 7th International Conference on WT1 in human neoplasia 2014年4月23日 バルセロナ (スペイン)

〔図書〕(計 1 件)

1. 橋本直哉 監修 太田富雄. 金芳堂. 脳神経外科学. 2016. 2870

〔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：
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

橋本 直哉 (HASHIMOTO, Naoya)
京都府立医科大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90315945

(2) 研究分担者

坪井 昭博 (TSUBOI, Akihiro)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号：10372608

千葉 泰良 (CHIBA, Yasuyoshi)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
府立母子保健総合医療センター(研究
所)・その他部局等・脳神経外科・医長
研究者番号：90533795

永野 大輔 (NAGANO, Daisuke)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70726520

高野 浩司 (TAKANO, Koji)
大阪大学・医学系研究科・招へい教員
研究者番号：90649203

福屋 章吾 (FUKUYA, Shogo)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50726502

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()