

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591687

研究課題名（和文） 骨髄由来幹細胞が有する脳腫瘍への tropism に関する検討

研究課題名（英文） Analysis of tropism of mesenchymal stem cell for brain tumor

研究代表者

吉本 幸司 (YOSHIMOTO KOJI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70444784

研究成果の概要（和文）：我々はこれまで骨髄由来幹細胞は脳腫瘍への **tropism** を有していることを明らかにしてきたが、今回このメカニズムを解析するために本研究を行った。その結果 PDGF-B によるシグナル伝達系が骨髄由来幹細胞の遊走能に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have reported that mesenchymal stem cell have tropism for brain tumor. This study show that tropism of mesenchymal stem cell for brain tumor may be mediated by PDGFR-B receptor signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2600000	780000	3380000
2008 年度	500000	150000	650000
2009 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3600000	1080000	4680000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

近年、成人の海馬や脳室下帯にも神経幹細胞 (Neural stemcell = NSC) の存在が確認され、脳腫瘍の領域でもその生物学的特徴の解析や治療への応用などに関する研究を行ってきた (Arano T et al. *Neurol Res* 2002). 局所あるいは全身投与されたマウス NSC は脳内あるいは循環血液中を遊走し、脳腫瘍等

の病理部位に集まり、また IL12 のような治療薬剤の vehicle としても使用できると報告されている (Aboody KS et al. *PNAS* 2000, HtshamMet al. *Cancer Res* 2002). しかしながら、神経幹細胞あるいは胎性幹細胞を実際のヒト脳腫瘍の治療に用いるには、技術的・倫理的な問題を含め多くの弊害が存在し、脳腫瘍患者自身の神経幹細胞を採取・培養し、

治療に応用する事は不可能に近いと考えられる。この問題に対する解決策として、骨髄由来の間葉系幹細胞 (**human Mesenchymal stem cell = hMSC**) を代用する方法は簡便かつより現実的であると考えられる。実際の臨床に応用する際の最も大きな利点は、骨髄由来の幹細胞は骨髄液から分離精製、培養するテクニックが既に確立されており (Pettinger et al. Science 1999)、加えて骨髄から採取するので脳腫瘍患者自身がドナーとなることができるという点である。MSCの **neural progenitor cell** への分化が証明されていることから、MSCを NSCとして代用することは非常に妥当性が高いと考えられ、MSCの生物学的な機能解析は、Glia治療への応用に向けて必須であると考えられる。我々は、新しい **delivery system**として hMSCが脳腫瘍に対する指向性 **tropism**を持つことを Texas 大学 MD Anderson Cancer Center (Dept of Neurosurgery, Dr. Lang's Lab) との共同研究にて世界に先駆けて発見、証明した (Nakanizo A et al. Cancer Res. 2005; 65(8): 3307-18)。Nude マウスにヒト **Glialoma cell** を移植して作製したヒト脳腫瘍モデルにおいて hMSC は内頸動脈内に投与されると脳腫瘍内に限局的に集簇する。さらに **adenovirus** を用いて MSCに β IFN遺伝子を導入し、 β IFN強制発現させると、腫瘍内で局所的に高濃度の β IFNを産生するようになり **in vivo** で劇的な治療効果を示した。

2. 研究の目的

我々は **nude** マウスに対してヒト **Glialoma cell** を移植した異種脳腫瘍モデルを作製し、hMSCがヒト **Glialoma cell** への **tropism** を有する事を証明した。しかしそのメカニズムについては全く解明されていない。また同実験系では **human-human interaction** の問題

が解決されていない。そこで本研究では以下の2点を明らかにすることを目的とした。

(1) 骨髄由来幹細胞 (MSC) が脳腫瘍に対して示す **tropism**にはどのような因子あるいはシグナル伝達系が関与しているかを明らかにする。また脳腫瘍内に集簇した MSCの動態を経時的に長期観察する事で、MSCの分化能や増殖能など生物学的な特徴を解明し、臨床応用に向けた安全性の評価も合わせて行う。一方、MSC が脳腫瘍へ及ぼす直接的な影響についても検討し、脳腫瘍からみた MSCの生物学的機能解析を行う。

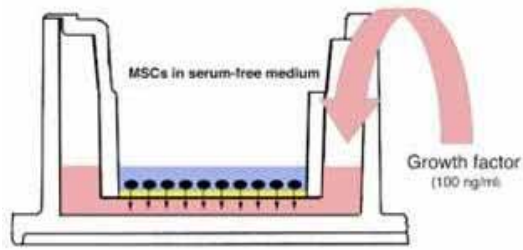
(2) ラットでの脳腫瘍モデルを作成し、ラットの骨髄由来細胞が初期実験と同様に脳腫瘍に対して **tropism**を示すかどうかを明らかにする。同種脳腫瘍モデルを使用することで **human-human Interaction** を排除した、より実際的な MSCの脳腫瘍に対する **tropism**の **mechanism** 解明が可能である。

3. 研究の方法

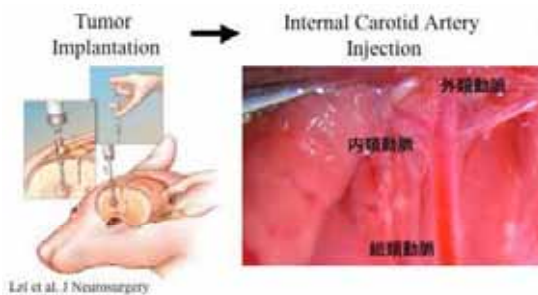
(1) MSCの脳腫瘍への **tropism**のおける **PDGF**シグナル伝達系の役割の解明

①U87 と LN229 のグリオーマ細胞株に **PDGFB**の発現プラスミドを **transfection** し、それぞれ **PDGFB**を高発現、低発現する長期安定株を選択する。

②**PDGFB**の発現量による浸潤能を **transwell**を用いて解析する。

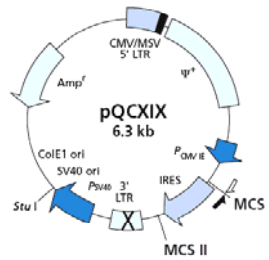


③PDGFBの発現量が tropism に及ぼす影響の解析を行う。PDGFB の発現量による tropism の違いを調べるために①で得られた細胞株をヌードマウスの前頭葉内に定局的に投与しマウスの脳腫瘍モデルを作成する。その後ルシフェーゼを発現するMSCを経動脈内から直接注入を行い、ルシフェリンを投与してMSCの集積を解析する。



(2) ラット脳腫瘍モデルを用いたラット骨髄由来幹細胞の脳腫瘍への tropism の検討

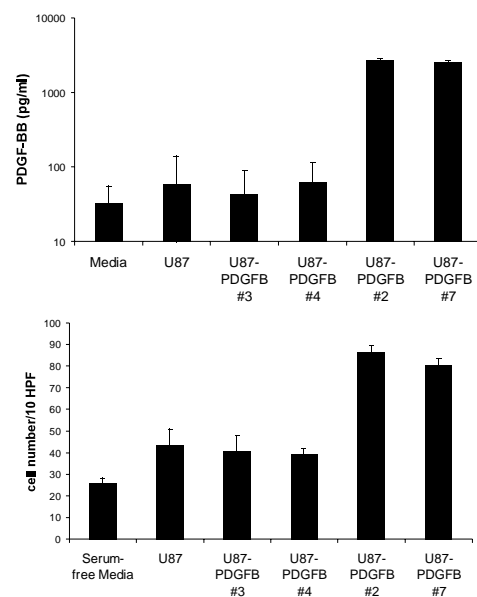
① 大脳白質に存在するグリア前駆細胞に PDGF を高発現するレトロウイルスベクターを感染させることで作成されたラット脳腫瘍モデルを作成する (Assarrah Met al, J. Neurosci. 2006)。このモデルでは短期間で PDGF を高発現するグリオーマが高率に発生するためにラットの脳腫瘍モデルとしては最適である。



②ラット由来のMSCを蛍光標識し、ラット脳腫瘍モデルの頸動脈内に注入し、数日後に sacrifice して組織切片を作成して、MSCの集積能を調べる。

4. 研究成果

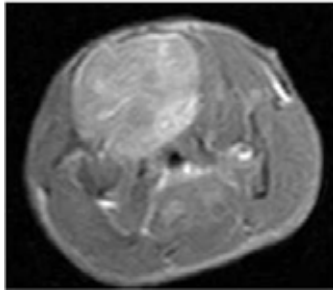
(1) PDGFB を高発現するクローンほど浸潤能が高い事が trans well assay 法により明らかになった。



(2) U87 を用いた in vivo での結果では PDGFB が MSC の遊走能に関与している可能性が示唆された。

(3) PDGFB を発現するレトロウイルスベクターによるラット脳腫瘍モデルの作成には成功した。

以下に実際のラット頭部 MRI にて確認された脳腫瘍の実例を示す。



このように数例モデルの作成はできたが、数が少なくこのモデルでのMBCの遊走能を解析することはできなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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:

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

吉本 幸司 (YOSHIMOTO KOJI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 70444784

(2) 研究分担者

庄野 禎久 (SHONO TADAHISA)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号: 00346792

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 70448413

(3) 連携研究者

()

研究者番号: