

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 年度～2009 年度

課題番号：19591690

研究課題名（和文）

低酸素状態における脳腫瘍細胞と血管内皮前駆細胞間のクロストーク解析と分子標的治療

研究課題名（英文）

Analysis of cross talk between human glioma cells and endothelial cells, and molecular targeted therapy

研究代表者

阿部竜也 (ABE TATSUYA)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40281216

研究成果の概要（和文）：

神経膠芽腫に代表される脳腫瘍では著明な血管新生が見られるものの、腫瘍細胞は異常な増殖により孤立した状態で十分に酸素も栄養分も届かないにも関わらず生存している。固形腫瘍では低酸素状態を呈するために、抗癌剤や放射線の感受性が低く、治療成績の低下、予後の悪化、再発の原因の一つとなっている。我々はこれまでに低酸素状態で働く転写因子 hypoxia-inducible factor1 α (HIF1 α) DNA の発現制御について着目し研究をすすめた。さらには同遺伝子を用いた遺伝子療法の研究を行ってきた。近年、HIF1 α 遺伝子は stromal cell-derived factor-1(SDF-1) とそのレセプターである CXCR4 遺伝子の発現を誘導させることが報告された。SDF-1 は CXCR4 陽性の stem cell や progenitor cell をリクルートし、虚血など組織障害の修復に働くことが分かってきた。このような反応は、虚血細胞とそれらを取り巻く間質系細胞が密接に関与していることを示すものと考えられる。このような低酸素下の微小環境は腫瘍自体が生存するために必要不可欠であると同時に、微小環境自体が腫瘍の性状を規定しているものと考えられる。そこで低酸素状態において腫瘍細胞と血管内皮細胞間のクロストークを解析すると同時に、それらに関与する幹細胞に関しても様々な段階で制御することによって、治療への応用を図ることを目的として研究をすすめた。

研究成果の概要（英文）：

Malignant brain tumor, such as glioblastoma, showed prominent angiogenesis, however tumor cells were growing without sufficient blood supply under hypoxic condition. The solid tumor, which showed the low sensitivity to chemoradiotherapy, led to a less favorable outcome, recurrence and poor prognosis. We previously have focused on hypoxia-inducible factor1 α (HIF1 α), transcription factor which worked under hypoxic condition. Recently, HIF1 α induced the expression of stromal cell-derived factor-1(SDF-1) and its receptor, CXCR4 gene. SDF-1 recruits CXCR4-positive stem cells and progenitor cell, and repairs the tissue damaged by hypoxia. These reactions are necessary for the tumors to survive under hypoxic condition. In addition, such hypoxic microenvironment regulates the tumor characteristics. Therefore, we analyzed the cross talk between human glioma cells and endothelial cells, and investigated the molecular targeted therapy. We aimed to control the stem cell under hypoxic condition and apply to the future medical treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000

年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍、血管内皮細胞、幹細胞、クロストーク、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

血管新生を促進または抑制する作用を指標として、これまでに様々な因子が血管新生に関与することが報告されている。特に VEGF (vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子) やアンジオポエチン (angiopoietin) といった血管内皮細胞に選択的に作用する分子が同定されたことによって、血管新生に関する研究はこの十年で飛躍的に進歩した。さらには血管内皮前駆細胞が発見され、従来の既存血管内皮細胞の再形成 (angiogenesis) の他に、血管内皮前駆細胞からの発生 (vasculogenesis) のメカニズムが関与することが明らかになった。生体の末梢血中に血管内皮前駆細胞の存在が報告され、この細胞は末梢血中の単核球成分の一部として循環しており、新たに血管が形成されている局所に取り込まれ、分化・増殖し、新規血管の形成に関与することが示された。これまで胎生期のみにもみられるとされていた血管発生 (vasculogenesis) が成熟個体でも観察され、新たな概念をもたらした。実際に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が脳腫瘍組織に発現している可能性が報告されていた。一方で神経膠芽腫に代表される脳腫瘍では著明な血管新生が見られるものの、腫瘍細胞は異常な増殖により孤立した状態で十分に酸素も栄養分も届かないにも関わらず生存している。固形腫瘍では低酸素状

態を呈するために、抗癌剤や放射線の感受性が低く、治療成績の低下、予後の悪化、再発の原因の一つとなっている。我々はこれまでに低酸素状態で働く転写因子 hypoxia-inducible factor1 α (HIF1 α) DNA の発現制御について着目し研究をすすめた (Neuro. Res. 2004、Oncology Res. 2005)。さらには同遺伝子を用いた遺伝子療法の研究を行ってきた。その結果 HIF1 α 遺伝子は脳血管の側副血行路を発達させ、脳梗塞の範囲を減じることが分かった (Neuro. Res. 2005、Neuroscience letters, 2006)。また近年、HIF1 α 遺伝子は stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) とそのレセプターである CXCR4 遺伝子の発現を誘導させることが報告されている。SDF-1 は CXCR4 陽性の stem cell や progenitor cell をリクルートし、虚血など組織障害の修復に働くことが分かってきた (Nat Med 10:858-864, 2004)。このような反応は、虚血細胞とそれらを取り巻く間質系細胞が密接に関与していることを示すものと考えられる。このような低酸素下の微小環境は腫瘍自体が生存するために必要不可欠であると同時に、微小環境自体が腫瘍の性状を規定しているものと考えられる。そこで低酸素状態において腫瘍細胞と血管内皮細胞間のクロストークを解析すると同時に、それらに関与する幹細胞についても様々な段階で制御することによって、治療への応用を図る

ことを目的とした。

近年primary (de novo) glioblastomaはsecondary glioblastomaと異なり、間質系の幹細胞のマーカーであるYKL-40, Tenascin C (TNC), osteonectin, CD105を発現し、間質系幹細胞の性格を有することが報告されている (Mol Cancer Res. 2006)。

幹細胞が腫瘍形成に関与しているとしたら、細胞は如何にして脳内に達し、腫瘍を形成するのであろうか？ 組織修復時にMSCのような間質系幹細胞が脳内に達し、腫瘍の血管形成に関与すると同時に腫瘍形成にも関与している可能性はあるのか？ このような仮説は未だ証明されておらず今後の解析が望まれている。そこで我々はin vitro とin vivoのモデル系を用い、このような仮説の検討を行うこととした。

2. 研究の目的

我々はこれまでに脳腫瘍の血管新生のモデル系を作成し、血管新生のメカニズムを検討するとともに、その阻害剤の開発や遺伝子治療について研究してきた。さらには低酸素状態で働く転写因子HIF1 α に着目し研究をすすめてきた。これらの研究でin vitroとin vivoの血管新生モデルを駆使し検討を行った。特にin vitroのモデルは腫瘍細胞と血管内皮細胞の共培養 (co-culture) 系で、腫瘍細胞と血管内皮細胞の相互作用をとらえることが可能になった。さらに我々の研究室では骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell: MSC) やhematopoietic stem and progenitor cell (HPC) の単離・培養を行っている。そこでこれらの細胞と腫瘍細胞の共培養を行なう。その際細胞を低酸素状態におきSDF-1とそのレセプターCXCR4, CXCL12を誘導させる。それらの相互作用をchemotaxis assayを用

いて検討を行なう。さらにはHIF1 α , SDF-1, CXCR4, CXCL12のsiRNAを用いた遺伝子レベルでの抑制、これらに対する中和抗体やペプチドなどを用い蛋白レベルでの抑制を試みる。また脳腫瘍治療薬であるtemozolomide (TMZ) や他の抗癌剤がこれらの一連の反応に及ぼす影響についても検討を加える。これらのin vitroで得られた結果を踏まえて、生体内の血管新生におけるMSCやHPCの働きについて、in vivoのモデル系を用いて調べる。MSCとHPCにマーカー遺伝子を導入しこれらの細胞が血管新生に及ぼす影響について病理学的、放射線学的検討を加えるとともに、これらを阻害する因子、薬剤について明らかにする。近年primary (de novo) glioblastomaが間質系幹細胞の特徴を有することが報告された。最終的にはMSCのような間質系細胞にmutant EGFRなどの癌遺伝子の導入を行い、それらの細胞が脳内に達し腫瘍形成能を有するかについて検討を加え、primary glioblastomaの起源にまで迫りたい。

3. 研究の方法

in vitroでの脳腫瘍細胞と血管内皮前駆細胞とのクロストークを解析するにあたり、骨髄間質細胞 (MSC) の単離培養、hematopoietic stem and progenitor cell (HPC) の単離培養、遺伝子ベクターの作成、低酸素状態での遺伝子発現の検討、chemotaxis assayによる血管誘導能の検討、co-culture systemによるクロストーク解析、in vitro共培養下におけるvasculogenesis、tumorigenesisの可能性試験などを行なった。

4. 研究成果

脳腫瘍移植モデルにおけるクロストーク解析、低酸素状態におけるクロストーク解析と

の観点に立ち研究した結果、これらの遺伝子が複雑に絡み合い、腫瘍の増殖、浸潤、血管新生に働いていることが判明し報告した。また、臨床的には出血を繰り返さず頭蓋内海綿状血管腫の患者では、血漿中のVEGFが上昇しており、活動期のマーカーとなりうることを報告した。

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 39 件)

1. Morishige M, Abe T, 他 Cerebral vasculitis associated with amyloid angiopathy. *Neurologia medico-chirurgica* 50 巻, 2010, 査読有, 336-338
2. Kamida T, Anan M, Shimotaka K, Abe T, 他 Usefulness of visualizing subdural electrodes with fusion CT/MR images during neuronavigation-guided epilepsy surgery. *Journal of Clinical Neuroscience* 査読有, 17 巻, 2010, 511-513
3. Ooba H, Abe T, 他 Increasing high-frequency oscillations (HFOs) in patients with brain tumors: implication for increasing amplitude of N20. *Clinical Neurophysiology* 査読有, 121 巻, 2010, 474-481
4. Abe E, Fujiki M, Nagai Y, Shiqi K, Kubo T, Ishii K, Abe T, 他 The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates geranylgeranylacetone-induced neuroprotection against cerebral infarction in rats *Brain Res.* 査読有, 1330 巻, 2010, 151-157
5. Ooba H, Abe T, 他 A stereotactic biopsy with electrical monitoring for deep-seated brain tumors: *World Neurosurgery* 査読有, (in press) 2010
6. 阿部竜也, 他 乳児期脳腫瘍手術における特殊性についての検討 脳腫瘍の外科-(原岡襄編)、なるにあ出版、査読無、2010(印刷中)
7. 大場寛、阿部竜也, 他 術中モニタリングを併用した深部脳腫瘍定位的生検術の検討 脳腫瘍の外科-(原岡襄編)、なるにあ出版、査読無、2010(印刷中)
8. Kamida T, Fujiki M, Ooba H, Anan M, Abe T, 他 Neuroprotective effects of edaravone, a free radical scavenger, on the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure* 査読有, 18 巻, 2009, 71-75
9. Abe T, 他 Intracranial infiltrating features of recurrent scalp dermatofibrosarcoma protuberans. *Journal of Clinical Neuroscience* 査読有, 16 巻, 2009, 1358-60
10. Anan M, Abe T, 他 The induction of collateral circulation by hypoxia-inducible factor-1 α decreased cerebral infarction in the rat. *Neurological Research* 査読有, 31 巻, 2009, 917-22
11. Abe T, 他 A glioblastoma mimicking a thrombotic aneurysm of the middle cerebral artery. *Neurosurgery Quarterly* 査読有, 19 巻, 2009, 212-213

12. Anan M, Inoue R, Ishii K, Abe T, 他 A rosette-forming glioneuronal tumor of the spinal cord: The first case of a rosette-forming glioneuronal tumor originating from the spinal cord. Human Pathology 査読有, 40 巻, 2009, 898-901
13. Abe T, 他 Surgical technique for anterior skull base reconstruction using hydroxyapatite cement and titanium mesh. Acta Neurochirurgica 査読有, 151 巻, 2009, 1337-1338
14. Abe T, 他 The association between high VEGF levels and multiple probable punctuate cavernous malformations. Acta Neurochirurgica 査読有, 151:855-859, 2009
15. Kamida T, Abe E, Abe T, 他 Edaravone, a free radical scavenger, retards the development of amygdala kindling in rats. Neuroscience Letter 査読有, 461 巻, 2009, 298-301
16. Abe T, 他 Functional motor recovery of an infant after a huge ependymoma resection. Clinical Neurology and Neurosurgery 査読有, 111 巻, 2009, 779-783. 2009
17. Kimura N, Ishibashi M, Masuda T, Morishige M, Abe T, Primary central nervous system lymphoma with cortical laminar hemorrhage. Journal of the Neurological Sciences 査読有, 287 巻, 2009, 281-284
18. Wakabayashi Y, Ishii K, Abe T, 他 Aberrant right subcravian artery with left carotid-basilar common trunk. Neurologia medico-chirurgica 査読有, 49 巻, 2009, 447-448
19. Ooba H, Abe T, 他 Malignant fibrous histiocytosis (MFH) after high-dose proton radiation therapy for anaplastic astrocytoma, Journal of Clinical Neuroscience 査読有, 16 巻, 2009, 1641-1643
20. Anan M, Kamida T, Abe E, Kubo T, Abe T, 他 A hemispherotomy for intractable startle epilepsy characterized by infantile hemiplegia and drop attacks. Journal of Clinical Neuroscience 査読有, 16 巻, 2009, 1652-1655
21. 阿部竜也, 他 前頭蓋底再建法の検討 脳腫瘍の外科 -Multimodality時代の脳腫瘍の外科-(河本圭司編) メディカ出版 査読無, 2009 pp311-317
22. Abe T, 他 Pilomyxoid astrocytoma: An immunohistologic study and review. Neurosurgery Quarterly 査読有, 18 巻, 2008, 60-63
23. Fujiki M, Kubo T, Kamida T, Sugita K, Hikawa T, Abe T, 他 Neuroprotective and anti-amnesic effect of donepezil, a nicotinic acetylcholine-receptor activator, on rats with concussive mild traumatic brain injury. Journal of Clinical Neuroscience 査読有, 15 巻, 2008, 791-796
24. Abe T, 他 Possible involvement of interferon β in postoperative vasculitis restricted to the tumour bed. Neurosurgical

- Review 査読有, 31 卷, 2008,447-450
25. Murata K, Abe T, 他 Difficulty in diagnosing a case with apparent sequel cerebral sparganosis. Surgical Neurology 査読有, 67 卷, 2007, 409-412
 26. Ooba H, Abe T, 他 Unique Infiltrating Morphology of Meningioma Surgical Neurology 査読有, 68 卷, 2007, 99-102
 27. Abe T, 他 Severe postoperative vasculitis of the central nervous system in a child with arteriovenous malformation Surgical Neurology 査読有, 68 卷, 2007, 317-321
 28. Kamida T, Fujiki M, Baba H, Ono T, Abe T, 他 The relationship between paired pulse magnetic MEP and surgical prognosis in patients with intractable epilepsy. Seizure. 査読有, 16 卷, 2007,113-119
 29. Fujiki M, Hikawa T, Abe T, 他 Navigated Brain Stimulation for Preoperative Anatomic and functional identification of impaired motor cortex in a patient with meningioma. Neurosurgery Quarterly 査読有, 17 卷, 2007, 33-39
 30. Abe T, 他 Overlapping free bone graft with galeal-pericranium in reconstruction of the anterior skull base prevented CSF leak and sequestrum formation. Acta Neurochirurgica 査読有, 149 卷, 2007, 771-775
 31. Momii Y, Izumi H, Shiota M, Onitsuka T, Abe T, 他 p73γ transactivates the p21 promotor through preferential interaction with the p300/CBP-associated factor in human prostate cancer cells. Oncology Report 査読有, 18 卷, 2007, 411-416
 32. Kamida T, Takeda Y, Fujiki M, Abe T, 他 Nitric oxide synthase and NMDA receptor expressions in cavernoma tissue with epileptogenesis. Acta Neurol Scand 査読有, 116 卷, 2007, 368-373
 33. Morishige M, Abe T, 他 Spontaneous chronic head and spinal subdural hematoma, Acta Neurochirurgica 査読有, 149 卷, 2007, 1081-1082
- [学会発表] (計 45 件)
- Abe T, 他 Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) treated only with chemotherapy. Society for Neuro-Oncology (SNO) 2009, October 22-24, New Orleans, LA
- [図書] (計 3 件)
 [産業財産権]
 ○出願状況 (計 0 件)
 ○取得状況 (計 0 件)
- [その他]
 ホームページ等
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
 阿部竜也 (ABE TATSUYA)
 大分大学・医学部・准教授
 研究者番号：40281216
 - (2) 研究分担者
 ()
 研究者番号：
 - (3) 連携研究者
 ()
 研究者番号：