

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659338

研究課題名（和文） 膠芽腫 Glomeruloid vessel は何を行っているか？

研究課題名（英文） What is the role of glomeruloid vessels in glioblastoma ?

研究代表者 高野 晋吾 (TAKANO SHINGO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50292553

研究成果の概要（和文）：

Glomeruloid vessel (GV)は膠芽腫に特徴的な血管であるが、その意義について遺伝子網羅的検索および免疫染色を行い、endoglin という血管内皮細胞の遊走に関与する蛋白の発現が高くみられ、endoglin は VEGF 中和抗体の作用をあらわすリン酸化 VEGFR2 および幹細胞マーカーである CD133 との局在が一致した。Endoglin は GV 内で血管内皮幹細胞の役割を持ち、VEGF 抗体の重要な標的となっている。Endoglin を標的とした血管新生抑制は内皮幹細胞も含めた効率的な治療となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Glomeruloid vessel (GV) is a hallmark of glioblastoma vasculature. The role of GV was investigated with genetic alteration and immunohistochemistry using human glioblastoma frozen section. Endoglin, that is related to endothelial cell migration, was up-regulated in GV compared to small tumor vessels and tumor cells. Endoglin was localized in endothelial cells with smooth muscle cell actin and co-localized with phosphorylated VEGFR2 (marker of VEGF antibody action) and CD133 (stem cell marker). Targeting endoglin has a possibility of a effective anti-angiogenic therapy damaging endothelial stem cell in glioblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：腫瘍学

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：膠芽腫、血管新生、腫瘍内皮細胞、ケモカイン、抵抗性、腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

Glomeruloid vessel (GV)は他の臓器の腫瘍ではみられない膠芽腫に特徴的な腫瘍血管であるが、その機能は不明である。GV は形態的には肥厚した内皮細胞・周皮細胞が重なりあい内腔が蛇行した、厚い基底膜をもつ血管で、放射線・化学療法治療終了後の再発組織、壊死組織内でも存続している。

2. 研究の目的

1)GVの役割

そこで、GV の中に腫瘍内皮幹細胞が存在し血管ニッチを形成することが膠芽腫を根絶できない理由のひとつではないかと考え、GV を構成する内皮細胞・周皮細胞の遺伝子を検索して、同じ血管新生が関与する腫瘍周辺の新生血管、脳動静脈奇形の奇形血管、周辺脳の正常血管との遺伝子発現の違いからその機能を模索し、さらに GV 内の腫瘍内皮幹細胞を標的とした治療を考案する。腫瘍内皮幹細胞を根絶することで、内皮細胞、周皮細胞が形成されず腫瘍血管が構築されず膠芽腫は増殖できなくなり、膠芽腫の根絶につながる萌芽的発想です。

2)硬膜動静脈奇形(dAVF)の血管新生因子

また、原因不明の硬膜動静脈奇形の発症機序の解明、血管新生因子を標的とした治療戦略を考えるために、治療診断・治療時の血管カテーテルからの血液サンプルにおける血管新生因子の解析を網羅的に行う。

3. 研究の方法

1)GV の意義:GV に腫瘍内皮幹細胞が存在するかどうかを、組織切片の遺伝子検索、免疫染色から明らかにする。そして GV 内の内皮

幹細胞に特異的な遺伝子を、奇形血管、胚発生時血管の内皮細胞特異的な遺伝子群から模索し、その特定の遺伝子をノックアウトすることで、腫瘍内皮幹細胞を根絶し、膠芽腫の増殖制御が可能になるかどうかを明らかにする。

① 組織からの RNA 抽出: 膠芽腫、脳動静脈奇形組織切片より laser capture

microdissection 法を用いて、a) GV, b) 腫瘍辺縁部新生血管、c) 腫瘍周辺部正常血管、d) 脳動静脈奇形を切りだし、RNA を抽出する。

まず、パラフィン切片からの RNA 抽出を行ったが、質的・量的に十分な RNA が抽出できなかった。そこで、凍結切片からの抽出に変更する。しかし凍結切片では血管の同定がしばしば困難であるため、凍結切片を factor VIII で染色したスライド上で laser microdissection を行う。Microdissection は5枚の連続凍結切片から、一つのチューブに組織を集めるように、3症例で行った。Factor VIII で染色される部分(膠芽腫の小血管)、SMA (smooth muscle cell actin)で染色される部分(膠芽腫の GV の成分が多い部分)、factor VIII および SMA で染色されない部分(血管成分以外=腫瘍成分)の3つの領域にわけて抽出した。

② DNA マイクロアレイ・定量的 RT-PCR: RNA

がうまく抽出できていることが確認し、次のステップに進んだ。RNA を cDNA に変換後、DNA マイクロアレイ(血管新生、内皮細胞バイオロジー、幹細胞・血管発達; SABiosciences)で GV において正常血管に対して発現が半分以上の遺伝子、半分以

下の遺伝子を選択する。RT-PCR で発現量を定量化し、発現が高い遺伝子と低い遺伝子を選択する。同様に GV において脳動脈奇形に対しても発現が高い遺伝子と低い遺伝子を選択する。

- ③ GV にみられた蛋白の膠芽腫での免疫染色: 上記の RT-PCR で定量し、発現の高かった蛋白の免疫染色を LSAB kit で行い、蛋白の膠芽腫内での局在を検討した。
- ④ GV 内の内皮幹細胞の同定: 膠芽腫を含む腫瘍幹細胞のマーカーと考えられている CD133 による免疫染色および、VEGF 中和抗体の効果をあらわすといわれている phosphorylated VEGFR2 による免疫染色を膠芽腫組織で行った。さらに、両者の局在を見るために2重蛍光染色を行った。

dAVF の血管新生因子: 方法

dAVF の発生に関わる血管新生因子の同定: この血管奇形は血管内手術で治療されることが多く、奇形組織をえる機会が少ない。従ってその発生原因は不明である。今回、奇形の診断・治療時のマイクロカテーテルからの 5 症例の血液サンプル(奇形部と末梢血液)の血管新生因子の蛋白発現 (RayBio Angiogenesis Antibody Array, Ray Biotech Inc.)を網羅的に行うことにより、本奇形の本質を同定した。

4. 研究成果

1) 膠芽腫組織内からの GV の遺伝子同定: 組織凍結切片から laser capture microdissection (LMD)法で glomeruloid vessel, small vessel, それ以外を分けて十分量の RNA が採取可能な、蛍光免疫染色の至適条件を求めた。次に smooth muscle cell actin (SMA) 染色による

glomeruloid vessel、CD34 染色による small vessel、その他の部分を3回の連続切片5枚より LCM を行い、全ての産物より RNA を抽出した。抽出した RNA からマイクロアレイで遺伝子発現を調べると、small vessel に比べて glomeruloid vessel に特に高発現する遺伝子として①Chemokine ligand 2, ②Endoglin を同定した。

2) GV 特異的遺伝子の同定:

この2つの蛋白のうち、endoglin についてヒト脳腫瘍サンプルの免疫組織化学でその局在を調べた。endoglin は、腫瘍血管、特に周皮細胞のマーカーである smooth muscle cell actin (SMA) との2重染色でみると、SMA 発現のある GV の内皮細胞に発現が強くみられた。

3) 膠芽腫血管内皮幹細胞の同定: 32 例の神経膠腫組織のパラフィン切片で pVEGFR2(リン酸化 VEGF 受容体 2)と CD133 抗体の二重染色を行なった。膠芽腫では pVEGFR2 陽性の血管内皮細胞は同時に CD133 陽性であり、その起源として血管内皮増殖部分にみられる GFAP 陽性細胞が推測され、腫瘍血管内皮幹細胞をみている可能性が考えられた。pVEGFR2 陽性の 2 例では VEGF 中和抗体 (bevacizumab) の反応が良好なのに対して、pVEGFR2 陰性の 2 例では反応が悪く、VEGF 中和抗体の治療反応性を表すバイオマーカーになりえる。また、腫瘍血管に内皮幹細胞が存在し、VEGF 中和抗体の作用機序のひとつとしてこれら内皮幹細胞を傷害する機序が考えられた。

4) 膠芽腫 GV に高発現する分子の局在と幹細胞マーカーとの関係

CD133との2重染色では endoglin と CD133 両者に陽性細胞が GV 内の内皮細胞にみられた。GV は内皮細胞の遊走に関係する endoglin を発現し、内皮幹細胞発現の候補の可能性を示した。Endoglin の機能解析について endoglin に対する siRNA を作成し、vitro で HUVEC の遊走能を検討した。

5) 現在までの達成度および今後の方針

Glomeruloid Vessel で endoglin が高発現し、膠芽腫の血管新生、腫瘍内皮幹細胞に関連することは明らかとなったが、まだ、機能解析が不十分である点、治療応用までの実験に至っていないためさらなる研究が必要である。

endoglin について、ヒト脳腫瘍サンプルの免疫組織化学でその局在は、腫瘍血管、特に周皮細胞のマーカーである smooth muscle cell actin (SMA) との2重染色では SMA 発現のある GV の内皮細胞に発現が強くみられた。CD133 との2重染色では endoglin と CD133 両者に陽性細胞が GV 内の内皮細胞にみられた。Endoglin の機能解析について endoglin に対する siRNA を作成し、vitro で HUVEC の遊走能を検討する。GV は内皮細胞の遊走に関係する endoglin を発現し、内皮幹細胞発現の候補の可能性を示した。

今後、今回の研究で明らかとなった Glomeruloid Vessel にみられる Endoglin をはじめ、腫瘍内皮幹細胞に関係する因子の治療応用を考える。これらの分子を標的とした光線力学療法、合成ペプチド療法を検討中である。

Dural AVF の血管新生因子

1) dAVF の血液検体の収集

ヒト脳内硬膜動静脈奇形の血管造影による診断・治療時に動静脈奇形の proximal と distal

に挿入されたカテーテルから血液を採取し-80度で保管した。これまでに5例の検体が収集された。5例の集積のあと、血液内の血管新生因子を網羅的に計測することにより、これまで報告のない硬膜動静脈奇形の発症に関する血管新生の役割および治療の標的分子を同定する。

2) dAVF の発生に係わる血管新生因子の同定

dAVF の近傍の血液サンプルの蛋白解析をマイクロアレイ (RayBio Angiogenesis Antibody Array) を用いて測定した。末梢血液に比べて dAVF 直前の血液で高い血管新生因子として IL-1beta, PECAM1, VEGFR2, VEGFR3 を同定した。これらは dAVF の発症に関わる因子、治療の標的因子、治療のバイオマーカーの可能性があり、さらに症例を蓄積して結果を明らかにする予定である。

3) dAVF の血管新生因子: 今後の方針

dAVF で高い発現のみられた血管新生因子はこれまでに報告がなく、現在 5 例にとどまっている解析をさらに進めるべく、各症例ごとのフォローアップ、バイオマーカーの可能性(治療前後での評価)、vivo モデルの作成による治療実験を検討する。

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 13 件) 全て査読有

1. 高野晋吾: 膠芽腫に対する血管新生抑制療法のトピックス. 総説. NO Shinkei Geka 40: 481-502, 2012.
2. Takano S: Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solution and new strategies based on molecular mechanisms of tum

- or vessel formation. *Brain Tumor Pathol* 29: 73-86, 2012.
3. Sakamoto N, Uemae Y, Ishikawa E, Takano S, Nakai K, Yamamoto T, Zaboronok A, Matsumura A: Glioma immunotherapy with combined autologous tumor cell and endothelial vaccination in vivo. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 52: 194-201, 2012.
 4. Osuka S, Takano S, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A: Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 52: 186-193, 2012.
 5. Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, Matsuda M, Nakai K, Yanagiya R, Morita S, Tsuboi K, Matsumura A: Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53 and internexin as a prognostic marker of glial tumors. *J Neurooncol* in press (2012) DOI 22396072.
 6. Tsuda K, Ishikawa E, Saito A, Satomi K, Sakata A, Takano S, Morishita Y, Noguchi M, Matsumura A: Primary cerebellar pilocytic astrocytoma with anaplastic features in a patient with neurofibromatosis type 1. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 51: 315-318, 2011.
 7. Sakamoto N, Ishikawa E, Yamamoto T, Satomi K, Nakai K, Sato M, Enomoto T, Morishita Y, Takano S, Ohno T, Tsuboi K, Matsumura A: Pathological changes after autologous formalin-fixed tumor vaccine therapy combined with temozolomide for glioblastoma – three case reports- *Neurol Med Chir (Tokyo)* 51: 319-325, 2011.
 8. Matsuda M, Yamamoto T, Ishikawa E, Nakai K, Zaboronok A, Takano S, Matsumura A: Prognostic factors in glioblastoma multiforme patients receiving high-dose particle radiotherapy or conventional radiotherapy. *Br J Radiol Spec No.1*: S54-60, 2011. DOI 21427185
 9. Kaneko MK, Tian W, Takano S, Suzuki H, Sawa Y, Hozumi Y, Goto K, Kitahara C, Kato Y: Establishment of a novel monoclonal antibody SMab-1 specific for IDH1 R132S mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 406: 608-613, 2011.
 10. Takano S, Yamashita T, Ohneda O: Molecular targets for glioma angiogenesis. *J Oncol* 2010. 2010-351908 Epub 2010, Apr 18, PMID 20414463
 11. Takano S, Kamiyama H, Mashiko R, Osuka S, Ishikawa E, Matsumura A: Metronomic treatment of malignant glioma xenografts with irinotecan (CPT-11) inhibits angiogenesis and tumor growth. *J Neurooncol* 99: 177-185, 2010.
 12. Takano S, Mashiko R, Osuka S, Ishikawa E, Ohneda O, Matsumura A: Detection of failure of bevacizumab treatment for malignant glioma based on urinary matrix metalloproteinase activity. *Brain Tumor Pathol* 27: 89-94, 2010.2010.
- [学会発表] (計 16 件)
1. 高野晋吾. 悪性脳腫瘍に対する血管新生抑制療法. 第 31 回日本脳腫瘍コンGRESS 総会 (ランチョンセミナー), 2011 年 5 月 8 日, パシフィコ横浜.
 2. 高野晋吾. グリオーマに關与する内皮細胞: 血管内皮前駆細胞と腫瘍血管内皮細胞. 第 6 回脳腫瘍の基礎シンポジウム (招待講演), 2011 年 1 月 29 日, 東京.

3. 高野晋吾. グリオーマにおける血管新生抑制療法の効果と耐性. 千葉がんシンポジウム(招待講演), 2011年1月15日, 幕張.
 4. 高野晋吾ら. 血管新生抑制療法の標的となる膠芽腫血管内皮細胞に特異的血管新生因子. 第28回脳腫瘍学会, 2010年11月28日, 軽井沢.
 5. 高野晋吾ら. 悪性神経膠腫に対する血管新生抑制療法の抵抗性の克服. 第69回日本脳神経外科学会総会, 2010年10月27日, 福岡.
 6. Takano S et al. CXCR7 specific inhibitor inhibits glioblastoma angiogenesis and growth in vitro and in vivo. 第69回日本癌学会, 2010年10月22日, 大阪.
 7. 高野晋吾ら. 血管新生抑制療法の標的となる膠芽腫血管内皮細胞に特異的血管新生因子. 第11回日本分子脳神経外科学会, 2010年8月27日, 仙台.
 8. 高野晋吾ら. グリオーマにおける低酸素領域の可視化と治療. 第28回脳腫瘍病理学会, 2010年5月21日, 大阪.
 9. Takano S et al. SDF-1 and CXCR7 are key molecules for glioma angiogenesis and invasiveness. 18th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, 2010年5月18日, Germany.
 10. 高野晋吾. グリオーマの血管と血管新生抑制療法. 第44回東北脳腫瘍研究会(招待講演), 2010年4月3日, 仙台.
 11. 高野晋吾. グリオーマの血管と血管新生抑制療法. 第44回東北脳腫瘍研究会, 2010年4月3日, 仙台.
 12. 高野晋吾, 石川栄一 他. グリオーマに対する VEGF 中和抗体の作用機序: 血管新生抑制と腫瘍細胞のアポトーシス増強. 第27回日本脳腫瘍学会, 2009年11月8日, 大阪.
 13. 高野晋吾, 大根田修 他. グリオーマ血管新生の分子標的療法. 第68回日本脳神経外科学会総会(シンポジウム) 2009年10月14日, 東京.
 14. Takano S, Ema M, Ishikawa E, Ohneda O et al. SDF-1 and CXCR7 are key molecules for glioma angiogenesis and invasiveness. 第68回日本癌学会. 2009年10月1日, 横浜.
 15. 高野晋吾, 大根田修 他. 膠芽腫血管新生における腫瘍血管内皮細胞の役割. 第10回日本分子脳神経外科学会 2009年9月19日岡山.
 16. Takano S, Ema M, Ohneda O, Ishikawa E et al. The role of chemokine SDF-1/CXCR4/CXCR7 for glioblastoma angiogenesis and glioblastoma derived endothelial cells. The 3rd Quadrennial Meeting of the WFNO 2009年5月11, 横浜.
- 〔図書〕(計2件)
1. 高野晋吾: 傍鞍部腫瘍の病理と分類(下垂体腺腫以外、間脳腫瘍含む)、下垂体疾患診療マニュアル、診断と治療社、p63-65, 2012
 2. 松村 明、高野晋吾: 傍矢状洞髄膜腫. イラストレイテッド脳腫瘍外科学、河本圭司、本郷一博、栗栖 薫 編集、医学書院、128-131, 2011.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
高野 晋吾 (TAKANO SHINGO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 50292553
 - (2) 研究分担者
中居 康展 (NAKAI YASUNOBU)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 40535069