

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700424

研究課題名（和文） がん幹細胞と血管内皮前駆細胞に照準を定めた悪性脳腫瘍に対する分子標的治療法の探索

研究課題名（英文） Novel treatment strategy molecularly targeting on cancer stem cell and endothelial progenitor cell for malignant brain tumors

研究代表者

深井 順也（FUKAI JUNYA）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50543774

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、悪性脳腫瘍幹細胞と血管内皮前駆細胞に着目し、これらに共通する細胞内シグナル伝達分子の発現を解析して新しい分子標的治療戦略として有望な標的分子を探索することである。本研究の結果のうち、ケモカインおよびその受容体がグリオーマ幹細胞の腫瘍原性および腫瘍血管新生に重要な役割を果たしており、その発現・機能を抑制することにより抗腫瘍効果がもたらされることから、悪性グリオーマ幹細胞に対する治療標的候補分子の一つとして期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to explore the novel therapeutic target, a molecule which is vital for cancer stem cell and endothelial progenitor cell, against malignant brain tumors. As a result, some promising target molecules were found, including chemokine and its receptor (CXCL/CXCR).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：悪性脳腫瘍治療

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：悪性脳腫瘍 がん分子標的治療 がん幹細胞 血管内皮前駆細胞

### 1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍の代表である悪性神経膠腫（グリオーマ）は、精力的な集学的治療を駆使しても、未だ治癒に至らぬ極めて予後不良の疾患である。現在、術後放射線照射にDNAメチル化剤のテモゾロミド化学療法を組み合わせる治療法が標準治療として行われているが、同治療法によっても膠芽腫の5年生存率は未だ10%にも届かない現状にある(Stupp R, et al. Lancet Oncol, 2009)。従って、悪性神経膠腫治療成績向上のためには、現行治療に抵抗する症例に対する新たな治療方法を

確立する必要がある。

化学放射線治療不応症例の腫瘍組織において、幹細胞関連遺伝子群が高発現しているという報告がある(Bao S, et al. Nature, 2008)(Murat A, et al. J Clin Oncol, 2008)(Liu G, et al. Mol Cancer, 2006)。最近の“がん幹細胞”理論によると、従来の化学療法の概念では、細胞周期が盛んに回転している増殖能の高い非癌幹細胞を殺すことはできても、細胞周期回転の遅い癌幹細胞には効果が少ないという考え方が導かれる。つまり、悪性脳腫瘍治療効果を向上させるためには、治療抵抗性に関与しているがん幹細胞

胞の機能を阻害する戦略が必要となる。そこで、応募者らは手術摘出サンプルから樹立した初代培養細胞を用いてグリオーマ幹細胞を単離し、その生物学的特徴を解析してきた。

治療抵抗例に対する戦略として、分子生物学的研究による腫瘍細胞内シグナル伝達経路異常に関する知見に基づいたがん分子標的治療薬に有効性が期待された。しかし、実際にはその効果は限定的であり (Vivanco I, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2010)、本邦で標準治療となっているものは未だ存在しない。ただ、現在進行中の臨床研究の中で、抗血管内皮成長因子 (VEGF) モノクローナル抗体であるベバシズマブによる再発悪性脳腫瘍に対する効果が注目されている (Norden AD, et al. Nat Rev Neurol, 2009)。悪性神経膠腫は豊富な腫瘍血管増生が特徴的で、腫瘍血管新生が亢進すると化学放射線治療に抵抗することが示唆されている。従って、血管内皮細胞に作用して腫瘍進行に欠かせない血管新生に関与する VEGF/VEGF 受容体シグナルを阻害することは、血管新生が抑制され抗腫瘍効果がもたらされる可能性が示唆され、実際に、画像検査上の腫瘍縮小や症状改善などの臨床効果が証明された。しかし同時に、その有効性は一時的であるという限界も明らかとなった。その理由として、VEGF/VEGF 受容体シグナル自体が悪性脳腫瘍の生存・増殖への関与が低いことから、その阻害作用だけでは直接的な抗腫瘍効果を生むとは考えにくく、腫瘍の根治に至らしめる治療ではない点が考えられる。今後、ベバシズマブが悪性脳腫瘍治療薬に加わる可能性があるが、この不応例に対する新たな戦略が必要となる。悪性脳腫瘍に対する血管新生抑制療法の限界を克服する新しい治療として、応募者らは、血管内皮細胞および血管内皮前駆細胞を含む骨髄由来細胞に注目して、腫瘍自体への直接的効果を同時に期待できる薬物併用療法を探索してきた。

## 2. 研究の目的

応募者は、これまでに行ってきた悪性脳腫瘍研究において、その分子生物学的特徴に注目した新しい分子標的治療の可能性について模索してきた。現在、前段で述べた悪性脳腫瘍治療に関する知見を踏まえ、【脳腫瘍幹細胞】と【血管内皮前駆細胞】に着目し、腫瘍自体への直接的抗腫瘍効果と血管新生抑制による間接的抗腫瘍効果をもたらす新規治療法を探索している。そして、これまでに神経および血管の発生・分化関連遺伝子群の細胞内シグナル伝達経路 (Eph/ephrin、Hedgehog、Notch、Wnt、TGF $\beta$  など) の発現を解析した結果、応募者らが樹立した悪性グリオーマ幹細胞にいくつかの治療標的候補

分子の発現上昇を確認した。本研究では、同候補分子 (発現・機能抑制) による抗腫瘍効果について検討を行う。

## 3. 研究の方法

応募者らはこれまでに悪性脳腫瘍手術摘出サンプルおよび同サンプルから樹立した初代培養細胞を用いて悪性グリオーマ幹細胞を単離し、その生物学的特徴を解析するとともに治療標的候補分子を探索した。神経および血管の発生・分化関連遺伝子群の細胞内シグナル伝達経路の発現上昇を認めた候補分子をリストアップした。本研究では、これらの機能解析を行い、治療標的分子としての可能性について検証する。具体的には、遺伝子導入あるいは薬剤投与による同分子の発現・機能を抑制することで、悪性脳腫瘍幹細胞の機能 (生存・増殖、遊走・浸潤、血管新生因子産生・分泌能) と骨髄由来血管内皮前駆細胞の機能 (血管新生能) への (抑制) 効果を培養実験系と異種移植動物モデルで検証する。

## 4. 研究成果

本研究の目的は、悪性脳腫瘍幹細胞と血管内皮前駆細胞に着目し、これらに共通する細胞内シグナル伝達分子の発現を解析して新しい分子標的治療戦略として有望な標的分子を探索することである。本研究の主要検討課題は悪性脳腫瘍幹細胞研究と血管新生研究とに大別できるが、その実施計画に従い平成 23 年度は悪性脳腫瘍幹細胞研究を実施した。

まず、悪性神経膠腫の手術摘出サンプルから初代培養細胞を樹立し、ニューロスフェア法を用いて悪性神経膠腫幹細胞を単離した。この細胞群をフローサイトメトリー法で解析すると、CD133陽性細胞が高率に含まれていた。スフェア形成細胞を血清含有培地で培養したのちに免疫染色すると、ニューロン/アス

トロサイト／オリゴデンドロサイトのマーカー分子をそれぞれ発現する細胞が確認できた。このCD133陽性細胞をNOD-SCIDマウスの脳内へ移植すると腫瘍が形成された。

次に、リアルタイムPCR法を用いて神経および血管の発生・分化関連遺伝子群の細胞内シグナル伝達経路 (Eph/ephrin、Hedgehog、Notch、Wnt、TGFβ など) の発現を解析した結果、いくつかの治療標的候補分子の発現上昇を確認した。この中で、Transcriptional Factor (TCF) の高発現に注目した。そこで、siRNA 技術を用いて TCF 発現をノックダウンしたところ、MTS アッセイで増殖能の低下、スクラッチアッセイで移動能の低下が確認できた。イムノブロットィングで、PI3K/Akt/mTOR 経路の抑制が特徴的であった。RT-PCR 法で、VEGF などの血管新生因子の発現が低下する傾向にあった。

以上の結果から、TCF は悪性神経膠腫幹細胞の腫瘍原性に重要な役割を果たしており、その発現・機能を抑制することにより抗腫瘍効果がもたらされることから、悪性脳腫瘍幹細胞に対する治療標的候補分子の一つとして期待される。

続いて平成24年度は血管新生研究を実施した。血管内皮前駆細胞 (EPOC) および血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、血管の発生・分化関連遺伝子群の発現を確認した。次に、GSC を EPOC もしくは HUVEC 培地で培養したのちに血管内皮関連遺伝子群の発現を解析した結果、いくつかの治療標的候補分子の発現上昇を確認した。この中で、Chemokine (CXCL)/chemokine receptor (CXCR) の高発現に注目した。そこで、siRNA 技術を用いて CXCL 発現をノックダウンしたところ、MTS アッセイで GSC の増殖能の低下が確認できた。RT-PCR 法で、VEGF などの血管新生因子の発現が低下する傾向にあった。

また、EPOCによる管腔形成能が低下する傾向があった。

以上の結果から、CXCL/CXCR は GSC の腫瘍原性および腫瘍血管新生に重要な役割を果たしており、その発現・機能を抑制することにより抗腫瘍効果がもたらされることから、悪性脳腫瘍幹細胞に対する治療標的候補分子の一つとして期待される。

## 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 1 件)

(1) 藤田浩二, 深井順也, 他, Oncogenic emergency における当院の対応、Neurosurgical Emergency、査読あり、17 巻、2012、134-138

[学会発表] (計 12 件)

① 深井順也, 他, 脳腫瘍幹細胞に関する最近の知見：とくに治療標的としてのグリオーマ幹 (様) 細胞について、第 40 回和歌山悪性腫瘍研究会、2012/12/15、和歌山県和歌山市

② 深井順也, 他, 中頭蓋窩に進展した腺様嚢胞癌：その進展機序の臨床病理学的検討、第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会、2012/11/25-27、広島県広島市

③ 深井順也, 他, 再発髄膜腫に対する個別化分子標的治療のための基礎的検討、社団法人日本脳神経外科学会 第 71 回学術総会、2012/10/17-19、大阪府大阪市

④ 深井順也, 他, 眼窩偽腫瘍の臨床経過と病理像：ウェゲナー肉芽腫症と診断された一例、第 30 回日本脳腫瘍病理学会、2012/5/24-26、愛知県名古屋

⑤ 深井順也, 他, 小児脳幹神経膠腫に対する治療：テモゾロミド初発プロトコルを施行した一例、第 29 回日本脳腫瘍学会、2011/11/27-29、岐阜県下呂

⑥ 深井順也, 他, 根治切除不能髄膜腫に対する個別化分子標的治療の可能性：初代培養細胞を用いた抗腫瘍効果の基礎的検討、第 70 回日本脳神経外科学会学術総会、2011/10/12-14、神奈川県横浜市

⑦ 深井順也, 他, CNS PNET と診断された一青年例の臨床経過と病理像、第 29 回日本脳腫

瘍病理学会、2011/05/20-21、東京都江戸川区

〔図書〕（計1件）

深井順也、他、丸善出版、イラストでわかる  
神経症候 機能・解剖学から診断へのアプ  
ローチ、2012、1-52

〔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

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深井 順也 (FUKAI JUNYA)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50543774

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

沖田 竜二 (OKITA RYUJI)  
和歌山県立医科大学・医学部・研究生  
研究者番号：  
八子 河邊 理恵 (YAKO-KAWABE RIE)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30458070