

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462272

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞を標的とした間葉系幹細胞による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic methods by mesenchymal stem cells targeting glioma initiating cells

研究代表者

篠島 直樹 (Shinojima, Naoki)

熊本大学・医学部附属病院・寄附講座教員

研究者番号：50648269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマの代表、膠芽腫は生存期間が約15ヶ月と難治性である。治療抵抗性の機序の一つに分裂静止期にあるグリオーマ幹細胞(glioma initiating cells, GICs)の存在が示唆されている。放射線・化学療法では通常の細胞分裂の盛んな腫瘍細胞は死滅するが、GICsは静止期にあるため生存し続け、何かしらの機序で静止期から細胞周期に入り分裂増殖し、その結果再発するとされている。本研究において再発の作用機序としてGICsの増殖制御にCD44陽性腫瘍関連間質細胞がNiche細胞として関与している可能性を見出した。CD44陽性腫瘍関連間質細胞の制御が再発制御につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma, a representative of malignant gliomas, is a lethal tumor with a median survival time of about 15 months. As one of the mechanisms of the resistance to the treatment, it is suggested that glioma initiating cells (GICs) exist in the quiescent state by exiting from growth and division cycles and remaining in G0 state. Radiation and chemotherapy are able to kill regular tumor cells existing in growth and division cycles, but not GICs existing in the quiescent state, resulting in survival of GICs. Thus GICs enter into the growth and division cycle from G0 state by some cues, proliferate, and as a result they will recur. In this study, we found that CD44+ cancer associated stromal cells may be involved in the regulation of GICs' proliferation as the niches. It has been suggested that control of the CD44+ stromal cells leads to the control of recurrence.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ幹細胞 腫瘍関連間質細胞 CD44 再発・再増大 Niches

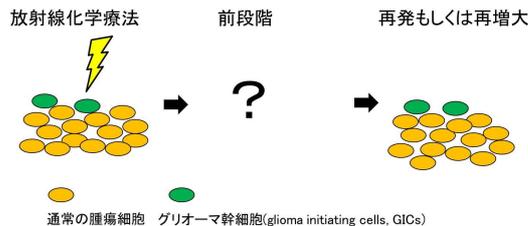
### 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマで最も頻度の高い膠芽腫の平均生存期間は手術、放射線化学療法の集学的治療を施しても約15か月、5年生存率10%未満で、予後は未だ極めて不良であり、新規治療法の開発が急務である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性である悪性グリオーマの新規治療の確立である。放射線化学療法に抵抗性を示す理由として1. 血液脳関門の存在、2. がん幹細胞 {グリオーマ幹細胞 (Glioma initiating cells, GICs)} の存在があげられる。本研究では1. を克服すべく血液脳関門を越え腫瘍特異的に集積可能な骨髄由来間葉系幹細胞を使用し、2. のグリオーマ幹細胞を標的とする新規治療法の開発・確立を目的とした。

当初腫瘍抑制性 microRNA をデータベースから選択し、抗腫瘍効果を網羅的に調べていく方法を予定していたが、別のアプローチを選択した。放射線・化学療法では通常の細胞分裂の盛んな腫瘍細胞は死滅するが、GICs は静止期にあるため生存し続け、何かしらの作用により静止期から細胞周期に入り分裂増殖し、その結果再発するとされている(下図)。従って再発の機序には GICs の増殖制御に関わる因子が深く関与していることが予想される。本研究ではその因子の同定を行い、これを標的とした治療法を確立することを目的とした。



### 3. 研究の方法

再発の機序を解明するには再発前段階の治療後組織が必要である。しかし再発前の脳検体を得ることは実臨床では困難である。そこで膠芽腫治療後に画像上再発が疑われ手術摘出したが、病理組織学的に再発でなく放射線壊死と診断された4症例の組織を再発前段階の組織とした。放射線壊死の診断後に2例が1年以内に再発、残る2例が再発なく経過し、再発例と非再発の再発前段階の組織を遺伝子及び蛋白解析で比較検討した。

免疫染色: CD133, Sox2, CD44

Fluorescence in situ hybridization (FISH): 10番染色体 (CEP10)

質量分析 (liquid chromatography (LC)-MS/MS system): GICs 存在領域のレーザーマイクロディセクションを行い質量分析\*

蛍光多重染色  
スペクトルイメージングカメラ (Nuance™, PerkinElmer)  
マルチスペクトルイメージング Vectraシステム (Mantra, PerkinElmer)

培養細胞解析  
Cell<sup>3</sup>imager (SCREEN)

Cases	Age/sex	Date of diag. of GBM	RT+chemo	Date of diag. of RN	Additional chemo	Recurrence within 1 year
1	40代/M	xx/xx/2000	60Gy+PAV	xx/xx/2001	none	-
2	30代/M	xx/xx/2004	60Gy+PAV, Novaris, TMZ	xx/xx/2010	TMZ	-
3	60代/M	xx/xx/2006	60Gy+TMZ	xx/xx/2006	TMZ	+
4	60代/F	xx/xx/2011	60Gy+TMZ	xx/xx/2011	TMZ	+

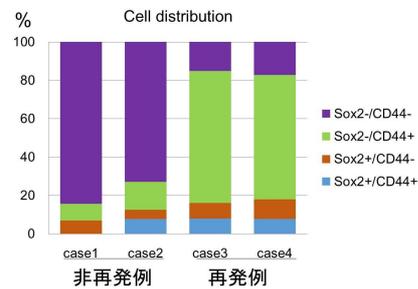
### 4. 研究成果

免疫染色、FISH (10番染色体) を行い、再発の有無に関わらず全例で GICs が存在した。また質量分析で、再発組織で CD44 が高発現していた。

Case #	細胞密度	核分裂像	Ki-67 LI (%)	CD133	Sox2	Chromosome 10	CD44
1	低	なし	0.0	+	+	monosomy	低発現
2	低	なし	1.5	+	+	monosomy	低発現
3	低	なし	1.0	+	+	monosomy + polysomy	高発現
4	低	なし	0.5	+	+	monosomy	高発現

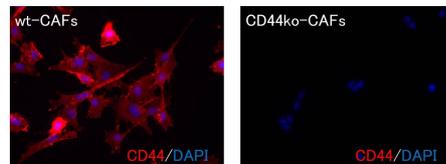
蛍光多重染色を行い再発例で GICs の近傍には幹細胞マーカー陰性の CD44 陽性間質細胞が多数存在した。

#### 多重免疫染色

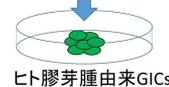


CD44knockout mice 由来 cancer associated fibroblasts (CD44ko-CAFs) と wild type mice の CAFs (wt-CAFs) から培養上清を採取した。我々が手術検体から樹立したヒト 膠芽腫由来 GIC lines をその CAFs 由来培養上清で培養したところ、CD44ko-CAFs に比べ wt-CAFs 由来培養上清で細胞増殖能や spheres 形成能が有意に亢進した。

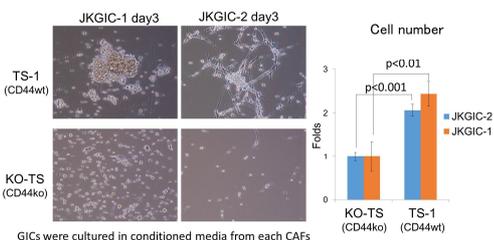
#### Cancer associated fibroblasts (CAFs)

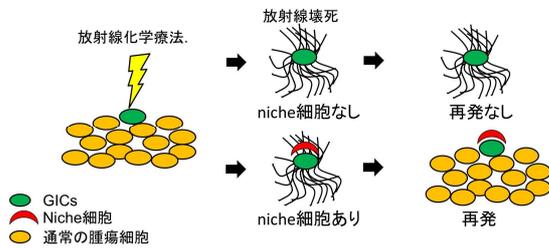


それぞれのCAFs由来培養上清



#### Conditioned mediaにおけるGICsの増殖能





CD44 陽性腫瘍関連間質細胞が GICs の Niche 細胞として再発・再増大に関与している可能性が示唆された。

再発・再増大に関与する分子の同定を行うため、質量分析に先立ち wt-CAFs から得た培養上清の限外濾過フィルター処理を行い分子量のしぼりこみを行っている (data not shown)。GICs の増殖を制御する、この Niche 細胞を標的とする治療が今後新たな治療法として確立する可能性があると思われた。

#### 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 19 件)

[1] Yano S, Hide T, Shinojima N: Efficacy and Complications of Endoscopic Skull Base Surgery for Giant Pituitary Adenomas. *World neurosurgery* 2017, 99:533-42. 査読有

[2] Yano S, Hide T, Shinojima N: Surgical Outcomes of Endoscopic Endonasal Skull Base Surgery of Craniopharyngiomas Evaluated According to the Degree of Hypothalamic Extension. *World neurosurgery* 2017, 100:288-96. 査読有

[3] Thomas JG, Parker Kerrigan BC, Hossain A, Gumin J, Shinojima N, Nwajei F, Ezhilarasan R, Love P, Sulman EP, Lang FF: Ionizing radiation augments glioma tropism of mesenchymal stem cells. *Journal of neurosurgery* 2017:1-9. 査読有

[4] Yamada K, Shinojima N, Hamasaki T, Kuratsu J: Pallidal stimulation for medically intractable blepharospasm. *BMJ case reports* 2016, 2016. 査読有

[5] Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura T, Shimokawa A, Takami H, Tanaka S, Mukasa A, Shirahata M,

Shimizu S, Suzuki K, Saito K, Kobayashi K, Higuchi F, Uzuka T, Otani R, Tamura K, Sumita K, Ohno M, Miyakita Y, Kagawa N, Hashimoto N, Hatae R, Yoshimoto K, Shinojima N, Nakamura H, Kanemura Y, Okita Y, Kinoshita M, Ishibashi K, Shofuda T, Kodama Y, Mori K, Tomogane Y, Fukai J, Fujita K, Terakawa Y, Tsuyuguchi N, Moriuchi S, Nonaka M, Suzuki H, Shibuya M, Maehara T, Saito N, Nagane M, Kawahara N, Ueki K, Yoshimine T, Miyaoka E, Nishikawa R, Komori T, Narita Y, Ichimura K: A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta neuropathologica communications* 2016, 4:79. 査読有

[6] Yano S, Kudo M, Hide T, Shinojima N, Makino K, Nakamura H, Kuratsu JI: Quality of Life and Clinical Features of Long-Term Survivors Surgically Treated for Pediatric Craniopharyngioma. *World neurosurgery* 2015. 査読有

[7] Yano S, Hide T, Shinojima N, Ueda Y, Kuratsu J: A flexible endoscope-assisted interhemispheric transcallosal approach through the contralateral ventricle for the removal of a third ventricle craniopharyngioma: A technical report. *Surgical neurology international* 2015, 6:S113-6. 査読有

[8] Yamamoto T, Shinojima N, Todaka T, Nishikawa S, Yano S, Kuratsu J: Meningioma in Down Syndrome. *World neurosurgery* 2015, 84:866 e1-6. 査読有

[9] Yamada K, Shinojima N, Hamasaki T, Kuratsu JI: Subthalamic nucleus stimulation improves Parkinson's disease-associated camptocormia in

parallel to its preoperative levodopa responsiveness. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 2015. 査読有

[10] Shinojima N, Nakamura H, Kuratsu J: Response. Journal of neurosurgery Pediatrics 2015, 16:350-1. 査読無

[11] Muta D, Kawano T, Shinojima N, Kuratsu J: Superficial temporal artery-to-middle cerebral artery bypass surgery for middle cerebral artery stenosis in a patient with cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. SpringerPlus 2015, 4:609. 査読有

[12] Hossain A, Gumin J, Gao F, Figueroa J, Shinojima N, Takezaki T, Priebe W, Villarreal D, Kang SG, Joyce C, Sulman E, Wang Q, Marini FC, Andreeff M, Colman H, Lang FF: Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. Stem cells 2015, 33:2400-15. 査読有

[13] Hide T, Yano S, Shinojima N, Kuratsu JI: Usefulness of the indocyanine green fluorescence endoscope in endonasal transsphenoidal surgery. Journal of neurosurgery 2015:1-8. 査読有

[14] Yano S, Hide T, Shinojima N, Hasegawa Y, Kawano T, Kuratsu J: Endoscopic endonasal skull base approach for parasellar lesions: Initial experiences, results, efficacy, and complications. Surgical neurology international 2014, 5:51. 査読有

[15] Yamamoto T, Kuroda J, Takezaki T, Shinojima N, Hide T, Makino K, Nakamura H, Yano S, Nishi T, Kuratsu J:

Characteristics of brain metastases from esophageal carcinoma. Surgical neurology international 2014, 5:137. 査読有

[16] Shinojima N, Nakamura H, Tasaki M, Kameno K, Anai S, Iyama K, Ando Y, Seto H, Kuratsu J: A patient with medulloblastoma in its early developmental stage. Journal of neurosurgery Pediatrics 2014, 14:615-20. 査読有

[17] Anai S, Hide T, Takezaki T, Kuroda J, Shinojima N, Makino K, Nakamura H, Yano S, Kuratsu J: Antitumor effect of fibrin glue containing temozolomide against malignant glioma. Cancer science 2014, 105:583-91. 査読有

[18] Shinojima N, Hossain A, Takezaki T, Fueyo J, Gumin J, Gao F, Nwajei F, Marini FC, Andreeff M, Kuratsu J, Lang FF: TGF-beta mediates homing of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells to glioma stem cells. Cancer research 2013, 73:2333-44. 査読有

[19] 篠島直樹、中村英夫、倉津純一：転移性腫瘍の遺伝的背景、Role of gene mutations in pathogenesis of metastatic brain tumors. 日本臨牀 74 巻 増刊号 7 (2016)、査読無

〔学会発表〕(計 20 件)

[1] Naoki Shinojima, Anwar Hossain, Tatsuya Takezaki, Juan Fueyo, Joy Gumin, Feng Gao, Felix Nwajei, Frank C. Marini, Michael Andreeff, Jun-ichi Kuratsu, Frederick F. Lang: TGF- Mediates Homing of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells to Glioma Stem Cells, The 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, San Francisco (USA), November 21-24, 2013

[2] 篠島直樹、中村英夫、田崎雅義、黒田順一郎、竹崎達也、植田裕、秀拓一郎、牧野敬史、矢野茂敏、倉津純一：膠芽腫の放射線壊死組織中にみられるグリオーマ幹細胞様細胞，第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会、宮崎市，12/8-12/10，2013

[3] 篠島直樹, 中村英夫, 牧野敬史, 黒田順一郎, 秀拓一郎, 矢野茂敏, 猪山賢一, 瀬戸弘, 倉津純一: 腫瘍内出血で発症した髄芽腫の一例, 第 31 回日本脳腫瘍病理学会、東京、5/24-5/25, 2013

[4] 篠島直樹, 中村英夫, 田崎雅義, 黒田順一郎, 竹崎達也, 植田裕, 秀拓一郎, 牧野敬史, 矢野茂敏, 倉津純一: 髄芽腫の放射線壊死組織中にみられるグリオーマ幹細胞様細胞, 第 72 回日本脳神経外科学会総会、横浜市、10/15-17, 2013

[5] 篠島直樹, 中村英夫, 高橋義信, 倉津純一: 高齢者髄芽腫に対する治療, 第 73 回日本脳神経外科学会総会、東京、10/9-11, 2014

[6] Naoki Shinojima, Hideo Nakamura, Masayoshi Tasaki, Kouki Kamen, Shigeo Anai, Ken-ichi Iyama, Yukio Ando, Hiroshi Seto, Jun-ichi Kuratsu: A patient with medulloblastoma in its early developmental stage. 16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, Singapore, June 28- July 2, 2014

[7] Naoki Shinojima, Hideo Nakamura, Masayoshi Tasaki, Takuichiro Hide, Keishi Makino, Shigetoshi Yano, Jun-ichi Kuratsu: Glioma stem cell-like cells in the tissue of radiation necrosis of glioblastomas. The 11th Meeting of Asian Society of Neuro-Oncology, Istanbul (Turkey), 9/10-9/15, 2014

[8] 篠島直樹, 中村英夫, 高橋義信, 黒田順一郎, 矢野茂敏, 倉津純一: 高齢者髄芽腫患者に対する治療, 第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会, 浦安市, 11/30-12/2, 2014

[9] 篠島直樹, 中村英夫, 矢野茂敏, 山田和慶, 三上芳喜, 倉津純一: Germinoma の再発・死亡例の検討, 第 33 回日本脳腫瘍病理学会, 高松市, 5/29-5/30, 2015

[10] Naoki Shinojima, Hideo Nakamura, Shigetoshi Yano, Kazumichi Yamada, Jun-ichi Kuratsu: MALIGNANT TRANSFORMATION OF PURE GERMINOMAS: TWO CASES REPORT, 4th international CNS Germ Cell Tumor symposium, Tokyo, 4/12-4/15, 2015

[11] 篠島直樹, 中村英夫, 矢野茂敏, 山田和慶, 倉津純一: 高齢者髄芽腫の治療, 第 28 回日本老年脳神経外科学会, 米子市、4/17/2015

[12] 篠島直樹, 中村英夫, 藤本健二, 矢野茂敏, 山田和慶, 市村幸一, 倉津純一: 高齢者髄芽腫における手術(後療法含めた積極的治療)の適応について, 第 74 回日本脳神経外科学会総会, 札幌市, 10/14-10/16, 2015

[13] 篠島直樹, 矢野茂敏, 秀拓一郎, 倉津純一: 当科における拡大法での鞍底形成と髄液漏防止効果, 第 22 回日本神経内視鏡学会, 宮城県松島, 11/28-11/29, 2015

[14] 戸高航平, 篠島直樹, 田崎雅義, 高倉伸幸, 倉津純一: 髄芽腫の再発・再増大にお

るグリオーマ幹細胞と niches の役割, 第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会, 京都, 12/6-12/8, 2015

[15] 篠島直樹, 中村英夫, 藤本健二, 矢野茂敏, 山田和慶, 市村幸一, 倉津純一: 高齢者髄芽腫患者の手術適応, 京都, 12/6-12/8, 2015

[15] 時松花梨, 篠島直樹, 矢野茂敏, 武末吉広, 倉津純一: 先端巨大症(GH 産生性下垂体腺腫)におけるGNAS1(Gs)変異の臨床的意義, 第 34 回日本脳腫瘍病理学会, 東京, 5/27-5/28, 2016

[16] 篠島直樹, 戸高航平, 牧野敬史, 中村英夫, 山田和慶, 矢野茂敏, 三上芳喜, 倉津純一: 中枢神経原発悪性リンパ腫におけるHD-MTX治療反応性の予測因子の検討, 第 34 回日本脳腫瘍病理学会, 東京, 5/27-5/28, 2016

[17] Naoki Shinojima, Hideo Nakamura, Kenji Fujimoto, Shigetoshi Yano, Kazumichi Yamada, Koichi Ichimura, Jun-ichi Kuratsu: The considerations for indication of optimal treatments in elderly Japanese patients with glioblastoma multiforme, 13th Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) Meeting, Sydney (Australia), 9/11-9/14, 2016

[18] 篠島直樹, 戸高航平, 牧野敬史, 中村英夫, 山田和慶, 矢野茂敏, 三上芳喜, 倉津純一: 中枢神経原発悪性リンパ腫の大量メソトレキセート療法に対する治療反応性の予測因子, 第 75 回日本脳神経外科学会総会, 福岡 9/29-10/1, 2016

[19] 篠島直樹, 矢野茂敏, 秀拓一郎, 倉津純一: 内視鏡下経鼻的頭蓋底腫瘍摘出術における2-surgeonsによるFour Hands Approach(FHA)の手術成績, 第 26 回間脳下垂体腫瘍学会, 福島市, 2/19-2/20, 2016

[20] 篠島直樹, 戸高航平, 牧野敬史, 中村英夫, 藤本健二, 山田和慶, 矢野茂敏, 三上芳喜, 倉津純一: 中枢神経原発悪性リンパ腫のHD-MTX療法に対する治療反応性の予測因子, 第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会, 甲府市, 12/4-12/6, 2016

〔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：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠島 直樹 (Shinojima, Naoki)  
熊本大学医学部附属病院・脳神経外科・機能  
神経外科先端医療寄付講座・特任助教  
研究者番号：50648269

### (2) 研究分担者

#1. 倉津 純一 (Kuratsu, Jun-ichi)  
熊本大学大学院生命科学研究部・脳神経外  
科・教授  
研究者番号：20145296

#2. 矢野 茂敏 (Yano, Shigetoshi)  
熊本大学大学院生命科学研究部・脳神経外  
科・准教授  
研究者番号：60332871

#3. 中村 英夫 (Nakamura, Hideo)  
熊本大学医学部附属病院・脳神経外科・講師  
研究者番号：30359963

#4. 牧野 敬史 (Makino, Keishi)  
熊本大学医学部附属病院・脳神経外科・講師  
研究者番号：90381011

#5. 秀 拓一郎 (Hide, Takuichiro)  
熊本大学医学部附属病院・脳神経外科・診療  
講師  
研究者番号：40421820

#6. 黒田 順一郎 (Kuroda, Jun-ichiro)  
熊本大学大学院生命科学研究部・脳神経外  
科・助教  
研究者番号：90536731

### (3) 連携研究者：なし

### (4) 研究協力者

#1. Frederick F. Lang  
Department of Neurosurgery, The  
University of Texas M. D. Anderson Cancer  
Center・Professor

#2. 田崎 雅義 (Tasaki, Masayoshi)  
熊本大学大学院生命科学研究部保健学系構  
造機能解析学・助教

#3. 安東 由喜雄 (Ando, Yukio)  
熊本大学大学院生命科学研究部・神経内科学・教授

#4. 市村 幸一 (Ichimura, Koichi)  
国立がん研究センター研究所・脳腫瘍連携研  
究分野・分野長

#5. 三上 芳喜 (Mikami, Yoshiki)  
熊本大学医学部附属病院・病理診断科・教授

#6. 高倉 伸幸 (Takakura, Nobuyuki)  
大阪大学微生物病研究所・情報伝達分野・教  
授

#7. 江良 択実 (Era, Takumi)  
熊本大学発生医学研究所幹細胞部門・幹細胞  
誘導分野・教授

#8. 山田 和慶 (Yamada, Kazumichi)  
熊本大学医学部附属病院・脳神経外科・機能  
神経外科先端医療寄付講座・特任教授