

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591684
 研究課題名 (和文) 空間的かつ時間的制御を可能とする悪性グリオーマに対する
 幹細胞療法の基礎的研究
 研究課題名 (英文) Preliminary study of the induction of malignant glioma apoptosis
 using mesenchymal stem cell-mediated delivery of TRAIL and IL12
 研究代表者
 中林 博道 (NAKABAYASHI HIROMICHI)
 高知大学・教育研究部医療学系・講師
 研究者番号：70346716

研究成果の概要：正常細胞に影響を与えず腫瘍細胞のみを細胞死へ誘導する TNF Related Apoptosis Inducing Factor (TRAIL)あるいは抗腫瘍性サイトカインであるインターロイキン (IL)12 遺伝子を組み込んだ幹細胞を悪性グリオーマに対する治療用細胞として利用する可能性を探るべく、ヒト可溶性 TRAIL を分泌させるためのベクターの構築、ヒト IL12 分泌用ベクターの構築ならびに我々が開発したグリオーマ特異的抗体を利用し治療標的性を持たせるために抗体遺伝子を導入用のベクターを構築した。さらにグリオーマの標的療法に利用できる薬物の検討も行い、MMI-166、Fasudil ならびに Arucanolide がヒト・グリオーマ細胞に対して抗腫瘍効果を持つことが示唆される結果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：(1) グリオーマ (2) 浸潤 (3) 血管新生

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、ヒト悪性腫瘍の中でも最も治療が困難な腫瘍の一つで、新世代の治療法の確立が期待されている。我々は、ウイルス・ベクター以外の安全性の高いベクターを悪性グリオーマをはじめとした中枢神経系疾患への治療手段として用いる可能性も探っている。

近年、血管内投与されたミクログリアや脳内に移植された神経幹細胞 (neural stem cell: 以下 NSC) は腫瘍や損傷部、炎症部へ遊走するという報告がなされ、ミクログリア

や NSC は中枢神経疾患治療用の道具として脚光を浴びている。我々はすでに骨髄由来のミクログリアを細胞・遺伝子工学的に改変し、中枢神経疾患の診断・治療に用いる研究にも着手している。一方、NSC は細胞表面に MHC class II 分子の発現が認められず、MHC class I 分子も低発現であり、移植後の急性拒絶反応を起こしにくい細胞であることが明らかとなっており、中枢神経病変に対する細胞療法のドナー (donor) 細胞にふさわしいと考えられている。

2. 研究の目的

ミクログリアやNSCを用いた悪性グリオーマ特異的な細胞療法についての基礎的研究を行うことを目論んだ。ミクログリアやNSCが元来備えている腫瘍近傍へ遊走する性格を利用するだけでなく、悪性グリオーマへの標的性を高める手段として、共同研究者（清水恵司）が開発したヒト悪性グリオーマに対する特異抗体を利用すること、正常細胞にはほとんど影響を与えず腫瘍細胞のみをアポトーシスへ誘導するTNF Related Apoptosis Inducing Factor (TRAIL)を利用すること、さらにIL-12などの抗腫瘍性サイトカインをベクター細胞に標的悪性グリオーマ細胞の近傍でのみ分泌させるシステム（tet-on system）の利用を考えた。まずはTRAILやIL-12の遺伝子をマウスの幹細胞やミクログリア細胞に組み込み、マウス脳腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果を検討することを研究の基本構想とした。さらにヒト・グリオーマに対するTRAILの抗腫瘍効果を増強したり相乗効果が期待できる他の標的療法についても同時に検討することとした。

3. 研究の方法

(1) NSCやミクログリアを用いたグリオーマ特異的な細胞療法についての基礎的研究

① Human sTRAIL を分泌させるためのベクターの構築：順天堂大学免疫学教室の八木田秀雄博士より供与を受けたhuman TRAILのplasmid DNA (human TRAIL/pMKIT neo) か forward primer: 5' -cagaggaagaagcaacaca-3', reverse primer: 5' -aaaaggccccgaa aaac - 3' を用いてsoluble (s) TRAILのcoding region (95-281) をPCRにて増幅した。分泌シグナルを持ったベクター(pSecTag2/Hygr)はInvitrogen社より購入し、このベクターのマルチ・クローニングサイトへ増幅したsTRAILのcDNA断片を挿入した。その後、ベクターが予定通りに構築できたか塩基配列を確認するためsequenceを行った。配列を確認したsTRAIL分泌用ベクター(pSecTag2-sTRAIL)をAmerican Type Culture Collection (ATCC)より購入したNIH/3T3細胞へ遺伝子導入し、安定発現株を選択した。安定発現細胞においてsTRAILが分泌されていることを確認するためにPCR、western blotならびにELISAを行った。次に遺伝子導入されたNIH/3T3細胞がヒト・グリオーマ細胞のapoptosisを誘導することを確認するため、sTRAIL安定分泌NIH/3T3細胞 2×10^5 個を10cmデッシュで培養し、培養上清を回収し、この培養上清をTRAILに感受性があると報告されているU87MG細胞の培地へ添加しU87MG細胞のapoptosis assayを行った。Apoptosis

assayには、Cell Death Detection ELISA (Roche Diagnostics)を用いた。

② Human IL12を分泌させるためのベクターの構築：ヒトIL12 (p35) のcDNAはOriGene社より購入した。IL12 cDNAをPCRにて増幅し、分泌シグナルを持ったベクター(pSecTag2/Hygro;Invitrogen)へ挿入し、ベクターが予定通りに構築できたか塩基配列を確認するためsequenceを行った。完成したIL12分泌用ベクター(pSecTag2-IL12)をNIH/3T3細胞へ遺伝子導入し、安定発現細胞が分泌するIL12の効果をSTAT4のリン酸化により確認した。

③ グリオーマ特異的抗体(ONS-M21抗体)のscFvを細胞表面に発現させるためのベクターの構築：ヒト型ONS-M21抗体のハイブリドマからVHおよびVLのcoding regionをPCRにて増幅した。細胞表面タンパク発現型ベクター(pDisplay)はInvitrogen社より購入した。増幅したVHおよびVLのcoding regionならびにそれらを連結するリンカー配列をpDisplayへ挿入し(ONS-M21-pD)、遺伝子挿入を確認するためにsequenceを行った。次いでONS-M21-pDのうちのVH、VL、リンカー配列ならびにPDGF receptorのtrans-membrane domainのcoding sequence、myc-tagを含んだ断片をPCRにて増幅した。ピューロマイシン選択性ベクターpApo-CMV Purはタカラバイオ(株)より購入し、このベクターへ増幅したDNA断片の挿入を試みた。構築されたベクターの塩基配列の確認のため、sequenceを行った。

④ マウス・ミクログリア細胞(MEB5)へのtet反応性遺伝子の導入：テトラサイクリン応答配列を導入導用のベクターであるpTet-On Advanced vectorはタカラバイオ(株)より購入した。またMEB5細胞は財団法人ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。pTet-On Advanced vectorを用いてMEB5細胞へのテトラサイクリン応答配列の導入を行い、遺伝子導入の確認のため、transfection後のMEB5細胞からtotal RNAを分離し、RT-PCRを行った。

(2) ヒト・グリオーマ細胞株に対するMMI-166の抗腫瘍効果について

Matrix metalloproteinases (MMPs)は腫瘍細胞の浸潤や腫瘍血管の新生に深く関わっているとされる。今回、MMP-2,9の阻害剤であるMMI-166を塩野義製薬より供与を受け、ヒト・グリオーマ細胞株の浸潤、血管新生、増殖に与える影響を検討した。T98G、U87MG、ONS12の3種のヒト悪性グリオーマ細胞株を用いた。ONS12は患者の手術摘出組織のprimary cultureから樹立した細胞である。

① 腫瘍細胞のMMP-2,9のタンパク発現に対

するMMI-166の影響：ヒト・グリオーマ細胞を24ウェル・プレートで培養し、培養液中に10 μ MのMMI-166を添加し24時間培養を行った後に培養上清を回収し、MMP-2, 9のタンパク濃度をEKISA kit (Amersham Pharmacia) を用い測定し、コントロール群 (MMI-166 非投与) と比較した。

②腫瘍細胞のMMP-2, 9 のmRNA発現に対するMMI-166の影響：ヒト・グリオーマ細胞を24ウェル・プレートで培養し、培養液中に10 μ MのMMI-166を添加し24時間培養を行った後に細胞を回収し、total RNA を分離し、以下のprimerを用いてRT-PCRを行い、コントロール群 (MMI-166 非投与) と比較した (MMP-2 forward primer, 5' -GAG ATC TGC AAA CAG GAC-3' and MMP-2 reverse primer, 5' -TTG GTT CTC CAG CTT CAG-3' ; the sequences of the MMP-9 forward and reverse primers were 5' -GAA TTC AGA ACC AAT CTC GAC AGG CA-3' and 5' - GAA TCC AGA ACC AAT CTC ACC GAC AGG CA-3')。

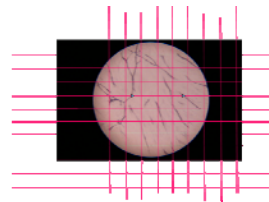
③腫瘍細胞から産生されるゼラチナーゼ活性 へのMMI-166の影響：gelatin zymography kit (YAGAI)を用いて行った。ヒト・グリオーマ細胞を6ウェル・プレートで10%FBS加DMEMで培養し 80% confluent に達したところで、培地を0.1%BSA加DMEMへ変更し24時間培養した上で培養上清を回収した。この培養上清に対して各種濃度(0.1-100 μ M)のMMI-166を加え gelatin zymography を行い、コントロール群 (MMI-166 非投与) と比較した。

④腫瘍浸潤へのMMI-166の影響：腫瘍細胞の浸潤に対する影響はMatrigel invasion assayにて評価した。BD Bioscience社のTranswell Invasion Chamberを使用し culture insert 法で行った。Lower chamberは走化性因子として12.5 μ g/dl フィブロネクチンを用いた。底面に8 μ mの小孔を持ったPET膜を有するupper chamber内に5 \times 10⁴個のグリオーマ細胞を培養し、upper chamber内には各種濃度 (0.1-100 μ M) のMMI-166を加えた。23時間後にinsert culture を回収し、PET膜の上面のゲルや残存細胞を綿棒できれいに除去し、PET膜の下面を70%エタノールで固定し、Matrigelを超えPET膜の下面へ到達した細胞数をカウントし、コントロール群 (MMI-166 非投与) と比較した。

⑤腫瘍が誘導する血管新生へのMMI-166の影響：腫瘍細胞が誘導する血管新生に対する影響を評価するため、in vitro angiogenesis assayを行った。クラボウ社(大阪)製 angiogenesis kit を使用した。このkitには、ヒト線維芽細胞とヒト臍帯静脈血管内皮細胞

(Human Umbilical Vein Endothelial Cell: HUVEC)が共培養されており、HUVECが管腔形成 (tube formation) し始めたところで出荷されている。このkitの培地の上へ、底面のPET膜に1 μ mの小孔を持ち液性因子は通過可能なinsert culture を設置し、このinsert culture内にヒト・グリオーマ細胞を培養することで、ヒト・グリオーマ細胞から分泌されるVEGFなどの血管新生誘導因子がHUVECへ作用できるようにし、この状態で共培養を行い、11日目にkitの細胞を4% paraformaldehyde (PFA) で固定し、抗CD31抗体で免疫組織染色し、HUVECによるtube formationを観察した。新生血管誘導の評価は、図1のようにグリッドとtube formationの交点の数を定量化し、コントロール群 (MMI-166 非投与) と比較した。

図1



⑥腫瘍細胞の増殖に対するMMI-166の影響：MTT assayを行った。グリオーマ細胞 1 \times 10⁵個を96ウェル・プレートで培養し、培養液中に各種濃度(0.1-100 μ M)のMMI-166を加えて培養した。24ならびに48時間後に培養液中に50 μ lのMTT溶液(MTT 2mgを1ml PBSに溶解したもの)を加え、プレートリーダーにて570nmの吸光度を測定し、それぞれコントロール群 (MMI-166 非投与) と比較した。

(3) ヒトグリオーマ細胞株に対するFasudil (HA-1077)の抗腫瘍効果について

悪性腫瘍においてはsmall GTPase Rhoが活性化されており腫瘍活性に影響を与えていると言われる。そこでRho-kinase inhibitorであるFasudilの抗腫瘍効果について検討した。T98G, U87MG, ONS12の3種のヒト悪性グリオーマ細胞株を用いた。FasudilはCalbiochem社から購入した。

①腫瘍細胞の浸潤に対するFasudilの影響：MMI-166を用いた検討と同様の手法 (Matrigel invasion assay)にて評価した。Fasudilの濃度は0.1-100 μ Mとし、コントロール群 (Fasudil 非投与) と比較した。

②腫瘍が誘導する血管新生へのFasudilの影響：MMI-166を用いた検討と同様の手法 (Angiogenesis assay)にて評価した。Fasudilの濃度は0.1-100 μ Mとし、コントロール群 (Fasudil 非投与) と比較した。

③腫瘍細胞の増殖に対するFasudilの影響：MMI-166を用いた検討と同様の手法 (MTT

assay)にて評価した。Fasudil の濃度は 0.1-100 μ M とし、コントロール群(Fasudil 非投与)と比較した。

(4) ヒト・グリオーマ細胞株に対する Arucanolide の抗腫瘍効果について

植物から抽出される セスキテルペノイド化合物 (sesquiterpene lactone) は、抗炎症作用を持つことが知られている。新規セスキテルペノイド化合物である Arucanolide がヒトグリオーマ細胞株に与える影響を検討した。Arucanolide は岐阜交際バイオ研究所の中川義仁博士より供与を受けた。用いたヒト・グリオーマ細胞は、SNB19 と U87MG である。

①腫瘍細胞の増殖に対する Arucanolide の影響: MMI-166 を用いた検討と同様の手法 (MTT assay)にて評価した。Arucanolide の濃度は 1-10 μ M とし、コントロール群(Arucanolide 非投与)と比較した。

②腫瘍が誘導する血管新生への Arucanolide の影響: MMI-166 を用いた検討と同様の手法 (Angiogenesis assay)にて評価した。Arucanolide の濃度は 0.1-10 μ M とし、コントロール群(Arucanolide 非投与)と比較した。

③腫瘍細胞の浸潤に対する Arucanolide の影響: MMI-166 を用いた検討と同様の手法 (Matrigel invasion assay)にて評価した。Arucanolide の濃度は 0.1-10 μ M とし、コントロール群(Arucanolide 非投与)と比較した。

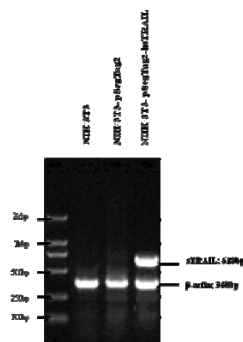
4. 研究成果

(1) ミクログリアや NSC を用いたグリオーマ特異的な細胞療法についての基礎的研究

①Human sTRAIL を分泌させるためのベクターの構築: sTRAIL の coding region を PCR にて増幅し、分泌シグナルを持ったベクター (pSecTag2/Hygro) へ挿入し、sTRAIL 分泌用ベクターを構築し、sequence を行い、塩基配列を確認した。

図 2a
RT-PCR

このベクターで NIH/3T3 細胞へ遺伝子導入し、ハイグロマイシンにて細胞を選択し、安定発現株を得た。この細胞において sTRAIL が分泌されていることを RT-PCR (図 2a)、western blotting(図 2b)および ELISA(図 2c)にて確認した。



sTRAIL gene を導入した NIH/3T3-pSegTag2-sTRAIL では sTRAIL のタンパクや mRNA の発現を認めるが、元の NIH/3T3 細胞や空ベクターのみを transfection した NIH/3T3 細胞

(NIH/3T3-pSegTag2)においては sTRAIL のタンパクや mRNA の発現を認めなかった。

図 2b
Western blotting

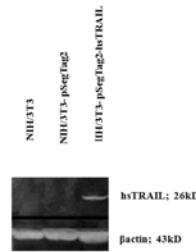
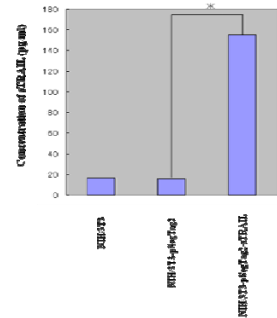
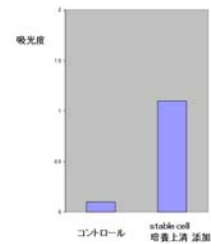


図 2c
ELISA



次にこの安定発現 2×10^5 個を培養し、培養上清を回収した。この培養上清を U87 MG 細胞の培地へ加えて 4 時間培養を続行し、その後 U87 MG 細胞のペレットを回収し、apoptosis assay を行ったところ、コントロール群 (細胞上清非添加) に比べ添加群で apoptosis が増加していた (図 3)。

図 3 Cell Death Detection
ELISA



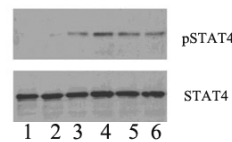
②Human IL12 cDNA を PCR にて増幅し、分泌シグナルを持ったベクター (pSecTag2/Hygro) へ挿入し、human IL12 分泌用ベクターを構築し (pSecTag2-IL12)、NIH/3T3 細胞へ遺伝

子導入し、ハイグロマイシンにて細胞を選択し、安定発現株 (pSecTag2-IL12-NIH/3T3) を得、この細胞が分泌する IL12 の効果を STAT4 のリン酸化により確認した (図 4)。

図 4

western blotting

1: NIH/3T3細胞, 2: 空ベクター (pSecTag2/Hygro) 遺伝子導入 NIH/3T3細胞
3-6: 選択細胞クローン (pSecTag2-IL12-NIH/3T3)



③ONS-M21 抗体のハイブリドーマから VH および VL の coding region を PCR にて増幅し、それらの cDNA に連結用のリンカー配列を加え、いったん、細胞表面タンパク発現型ベクター (pDisplay) へクローニングを行った。次いで抗体遺伝子 (VH + VL)、リンカー配列ならびに PDGF receptor の transmembrane domain の coding sequence、myc-

tag を含んだ断片を PCR にて増幅し、ピュアロマイシン選択性ベクター pApo-CMV Pur へ挿入した。構築したベクターの塩基配列を sequence にて確認した。

④ pTet-On Advanced を用いてテトラサイクリン応答配列を導入した MEB5 細胞を構築し、遺伝子挿入を RT-PCR にて確認した。

今後、Tet-On MEB5 細胞へ上記 (①-③) のベクターを用いて遺伝子導入を行い、細胞表面に ONS-M21 scFv を発現し、かつテトラサイクリンに反応して sTRAIL あるいは IL12 を分泌するという、グリオーマ治療用の遺伝子改変 MEB5 細胞の構築が完成することになり、それら遺伝子改変 MEB5 細胞を用いてヌードマウスの脳へヒト・グリオーマ移植モデルにおける細胞療法の効果の検討を行い、さらに同様の手法でマウス間葉系幹細胞の遺伝子改変に取りかかる予定である。

(2) ヒト・グリオーマ細胞株に対する MMI-166 の抗腫瘍効果について

① 腫瘍細胞の MMP-2, 9 のタンパク発現に対する MMI-166 の影響: ELAISA にて評価したところ MMI-166 投与群では非投与群に比べ培養上清の MMP-2, 9 のタンパク量が低下した。

② 腫瘍細胞の MMP-2, 9 の mRNA 発現に対する MMI-166 の影響: RT-PCR にて mRNA の発現を評価したところ、MMI-166 はグリオーマ細胞の MMP-2, 9 の mRNA 発現レベルには影響を与えないことが示された。

③ 腫瘍細胞から産生されるゼラチナーゼ活性への MMI-166 の影響: zelatin zymography 施行したところ、MMI-166 の濃度が上昇するにつれグリオーマ細胞のゼラチナーゼ活性が抑制されることが示された (図 5)。

④ 腫瘍浸潤への MMI-166 の影響: Matrigel invasion assay を行ったところ、MMI-166 の濃度が上昇するにつれグリオーマ細胞の浸潤が抑制されることが示された (図 6)。

⑤ 腫瘍が誘導する血管新生への MMI-166 の影響: Angiogenesis assay にて MMI-166 の濃度が上昇するにつれグリオーマ細胞によって誘導される新生血管が減少することが示された (図 7)。

⑥ 腫瘍細胞の増殖に対する MMI-166 の影響: MTT assay において MMI-166 はヒト・グリオーマ細胞の増殖に影響を与えなかった。

以上より MMI-166 が悪性グリオーマ細胞に対して抗腫瘍効果を持つことが示唆された。

図 5

Gelatin zymography

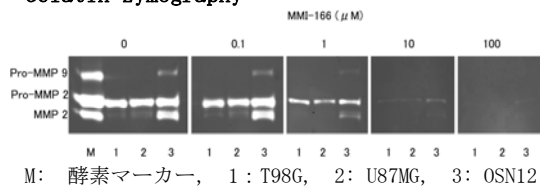


図 6

Matrigel Invasion Assay

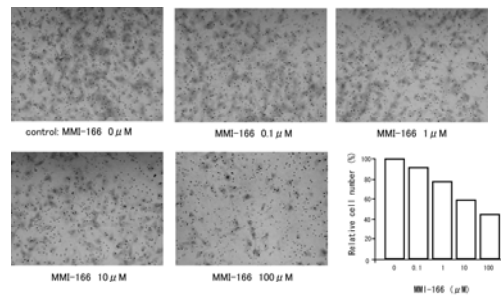
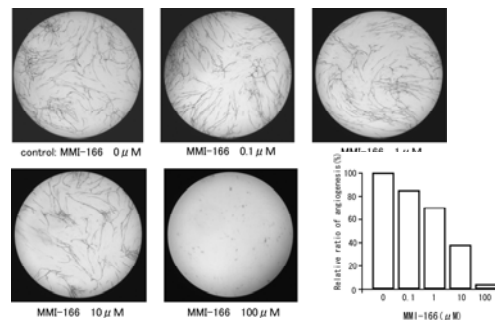


図 7

In vitro angiogenesis assay



(3) ヒトグリオーマ細胞株に対する Fasudil の抗腫瘍効果について

① 腫瘍細胞の浸潤に対する Fasudil の影響: Matrigel invasion assay を行ったところ、Fasudil の濃度が上昇するにつれグリオーマ細胞の浸潤は抑制された (図 8)。

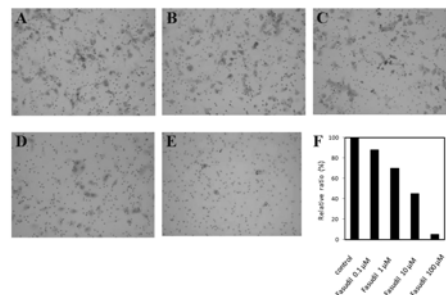
② 腫瘍が誘導する血管新生への Fasudil の影響: Angiogenesis assay にて Fasudil の濃度が上昇するにつれグリオーマ細胞によって誘導される新生血管は減少した (図 9)。

③ 腫瘍細胞の増殖に対する Fasudil の影響: MTT assay にて Fasudil はグリオーマの増殖自体には影響を与えないことが示された。

以上の結果から、Fasudil がヒト・グリオーマ細胞に対して抗浸潤、血管新生効果を示すことが示唆された。

図 8

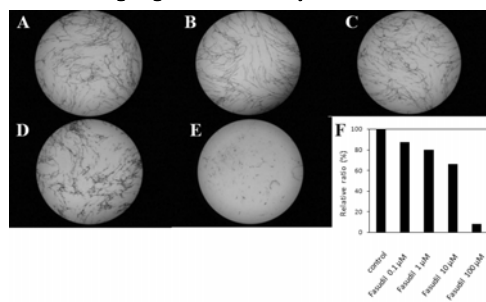
Matrigel Invasion Assay



Fasudil 濃度: B, 0.1 μM ; C, 1 μM ; D, 10 μM ; E, 100 μM
E, 100 μM (A, control)

図 9

In vitro angiogenesis assay



Fasudil 濃度: B, 0.1 μM; C, 1 μM; D, 10 μM; E, 100 μM (A, control)

(4) ヒトグリオーマ細胞株に対する Arucanolide の抗腫瘍効果について

①腫瘍細胞の増殖に対する Arucanolide の影響: MTT assay にて Arucanolide は濃度依存的に U87MG 細胞の増殖を抑制した。

②腫瘍が誘導する血管新生への Arucanolide の影響: Fasudil の濃度が上昇するにつれグリオーマ細胞によって誘導される新生血管が減少した(図 10)。

③腫瘍細胞の浸潤に対する Arucanolide の影響: Arucanolide の濃度が上昇するにつれグリオーマ細胞の浸潤が抑制された(図 11)。

以上の結果から、Arucanolide がヒト・グリオーマ細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

図 10

In vitro angiogenesis assay

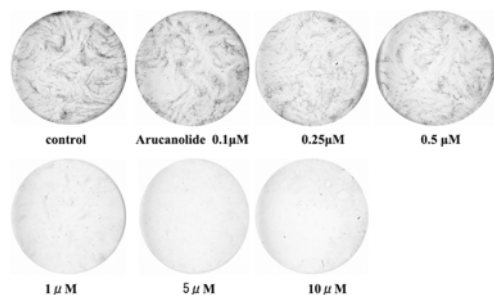
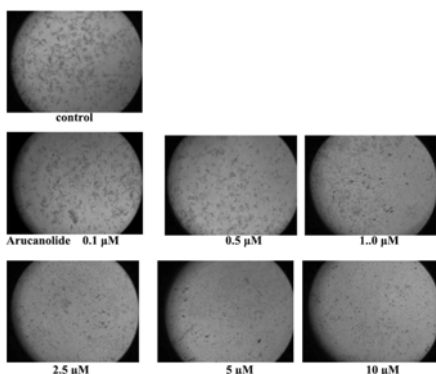


図 11

Matrigel Invasion Assay



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 2 件)

- ① Nakai E, Oark K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakabayashi H, Shimizu K: Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. Cancer Investigation, 2008, in press, 査読有
- ② Nakabayashi H, Nakashima M, Hara M, Toyonaga S, Yamada SM, Park KC, Shimizu K: Clinico-pathological significance of RCAS1 expression in gliomas: A potential mechanism of tumor immune escape. Cancer Letters 246:182-189, 2007, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Shimizu K, Ikenaka K, Kawanishi Y, Tamura M, Yawata T: Killing activity of suicide gene therapy against cancer stem cells. 16th European Society of Gene & Cell Therapy Annual Congress, 2008/11/13-16, Belgium
- ② 中林博道, 八幡俊男, 田村雅一, 清水恵司: ヒト・グリオーマ細胞に対する parthenolide の抗腫瘍効果について. 社団法人日本脳神経外科学会第 67 回学術総会, 2008/10/1-3, 岩手

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中林 博道 (NAKABAYASHI HIROMICHI)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号: 70346716

(2) 研究分担者

清水 恵司 (SHIMIZU KEIJI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 70116044

八幡 俊男 (YAWATA TOSHIO)

研究者番号: 40380323

高知大学・教育研究部医療学系・助教

梶 豪雄 (KAJI TAKAO)

東北大学・未来医工学治療開発センター・助教

研究者番号: 70343366

政平 訓貴 (MASAHIRA NORITAKA) ※2007

高知大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80444769