

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09497

研究課題名(和文)炎症性ケモカインCCL2阻害薬によるグリオーマ腫瘍幹細胞休止期駆逐療法の基礎研究

研究課題名(英文)Inflammatory chemokine CCL2 inhibitor for quiescent eradication of glioma tumor stem cells

研究代表者

浅野 研一郎(Asano, Kenichiro)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90312496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマ細胞の浸潤性の強さを利用し、一カ所に遊走沈着させることにより効率的な治療を目指してきた。しかしin-vivoの実験系で再発があり幹細胞系の遺残が原因と示唆され、CCL2カスケードにてG0期にある幹細胞をG0期から脱した状態で抗がん剤を感作する幹細胞休止期駆逐療法を開発した。In-vitroにて10~100nmol/ml CCL2阻害剤が至適濃度であることが簡易フローサイトメータのG1レベルで確認された。In-vivoでは周囲の炎症反応とともに腫瘍免疫反応が強く、抗VEGF投与にて脳浮腫を軽減、TMZを投与するモデルを確立した。生存日数の延長を見たが従前群と有為差は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性グリオーマ細胞の性質を逆手にとった治療法の開発である。浸潤性性格を利用し吸着療法をおこない、抗腫瘍薬や放射線の効果が期待できないG0腫瘍休止期をCCL2阻害剤で感受性のある細胞回転期に駆逐して腫瘍根絶を狙う新機軸の治療法である。結果として生命予後の延長が見られているが、有為差は得られなかった。原因としてはこの実験では放射線を使用していないこと、また複雑な腫瘍免疫応答や各種炎症反応が複雑なことが原因と考える。しかしこの新機軸の治療法は他の癌腫での応用も可能であるため、今後さらなる研究の改良と継続が必要である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study has been to efficiently treat malignant glioma cells by taking advantage of their strong invasive potential to migrate and deposit them in a single location. However, in-vivo experiments showed recurrence, suggesting that the cause was residual stem cell lineage. We developed a stem cell quiescence eradication therapy that sensitizes stem cells in the G0 phase of the CCL2 cascade to anti-cancer drugs while they are out of the G0 phase. In-vitro, the optimal concentration of 10~100nmol/ml CCL2 inhibitor was confirmed by G1 level of simple flow cytometer, and in-vivo, the tumor immune response was strong as well as the surrounding inflammatory response. The survival time was prolonged, but not significantly different from the previous group.

研究分野：脳神経外科

キーワード：腫瘍幹細胞 駆逐療法 CCL2阻害剤 悪性グリオーマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマの治療はブレイクスルー的な根治的治療法はなく治療成績の向上がない。原因は腫瘍細胞の浸潤性の強さと細胞休止期(G0)にある腫瘍幹細胞の存在である。申請者は浸潤に対し腫瘍細胞を吸着させ腫瘍を根絶、排出させる手法は完成した。しかしG0期にある腫瘍幹細胞の存在により *in vivo* にて再発を来していた。そのため SCF 複合体型ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットの一つである Fbxw7 に注目し、Fbxw7, c-Myc, notch, 炎症性ケモカイン CCL2 カスケードを利用し、CCL2 阻害剤にて処理、G0 期から脱した状態で従来の抗腫瘍薬を感作させ、幹細胞系を根絶させ治癒をめざす。

悪性グリオーマの治療は現在までブレイクスルー的な根治的治療法はなく、治療成績の劇的な向上がない。これに対し本実験の特徴は3点ほどある。1) 浸潤した腫瘍細胞を高濃度プロテオグリカン人工基質に吸着させ、人工基質を再摘出することなく定位的にプラスミンを注入し、融解・排出することにより根治させる試みは今までにない特色であり、独自性のある治療法である。2) プラスミン融解療法の欠点である周辺組織における幹細胞遺残の問題に対し、プロパゲルマニウムを用いる腫瘍幹細胞休止期駆逐療法は、放射線が省略できる利点があり高齢者や若年者への恩恵も多い。また再発時治療の選択肢が広がると予想される。3) 将来安全性が担保され臨床応用が可能となれば、特別な高度技術も不要で即臨床応用可能と予想される。

開発が成功すれば、悪性グリオーマの根治が達成できる可能性がある。この考えに基づく研究は初の試みであり極めて斬新な着想に基づく研究である。このプロジェクトが成功すれば他の脳腫瘍や各種癌に対しても応用可能となると予想され、最終的な目的は脳神経外科領域を超えた新しい領域研究手法につながる背景がある。

2. 研究の目的

悪性グリオーマが予後不良の原因として浸潤性の強さが考えられる。申請者は腫瘍細胞の浸潤を防止し、遊走沈着させることにより効率的な治療が可能になると考え、腫瘍摘出術後間接的細胞接着因子増強作用を有する分子標的治療薬を摘出面に塗布、腫瘍細胞を凝集させることに成功。プロテオグリカン人工基質に細胞を吸着後プラスミンで融解排出させ腫瘍細胞を根絶させる実験に成功した。しかし *in-vivo* の実験で再発があり幹細胞の遺残が原因と示唆された。そのため幹細胞を G0 期から脱した状態で抗がん剤を感作する、腫瘍幹細胞休止期駆逐療法が有効と推定される。そのため炎症性ケモカイン CC motif chemokine ligand 2 (CCL2)カスケードを利用し、CCL2 阻害剤にて処理、G0 期から脱した状態で抗がん剤にて処理し、幹細胞系を根絶させ、治癒をめざす治療法を *in vitro* と *in vivo* にて明らかにする。

3. 研究の方法

In vitro にて腫瘍幹細胞休止期から細胞回転周期へ乗ることができるかを確認、*In vivo* にてこの腫瘍幹細胞駆逐療法が可能であるのかの確認、そして生存解析の3段階で研究を行うこととした。

1) *In vitro* 腫瘍幹細胞休止期駆逐療法の確立

基底膜を模して作られた ECMatrigel に C6-GFP を入れ 48 時間インキュベートし浸潤モデルを作成する (Asano K, et al. J Neuro-Oncol 70: 3-15, 2004)。適濃度 0.1nmol/ml の AG1478 を ECMatrigel へ投与。抗腫瘍効果と間接的 N-Cad 増強作用により、C6-GFP を凝集させる (Asano K, et al. Neurosurgery 69: 399-410, 2011)。5nmol/ml 高濃度プロテオグリカンとフィブリンルーで人工基質を作成、C6-GFP を遊走人工基質に吸着させる。約 1 週間反応させた後、1.0nmol/ml プラスミンで融解、プロパゲルマニウムを投与する。

解析として画像解析ソフトを用いて ECMatrigel に残存する C6-GFP の有無、人工基質に遊走した C6-GFP、融解液中の細胞数を計測し、効果を検討する。またフローサイトを使用して休止期細胞の存在を確認する (G1 期を指標)。

2) 動物モデルを用いた腫瘍幹細胞休止期駆逐療法確立

脳腫瘍移植モデルの腫瘍摘出術後一連の実験モデルを作成する。プラスミンを注入し融解後洗浄排出後摘出腔にプロパゲルマニウムを投与。その後テモゾロミド(TMZ)の内服療法を行い、安楽死後病理標本を摘出。細胞駆逐療法が確立していることを確認する。

(1) ラット右前頭葉へ定位的に C6-GFP 細胞を 10ul (1×10^6 /ml) 接種、2 週間後開頭にて脳腫瘍摘出術を行う。腫瘍摘出後 AG1478 を摘出面に局所投与し、摘出腔に高濃度プロテオグリカン人工基質を注入する。3 週間目定位的に 1.0nmol/ml プラスミンを局所投与する。

(2) 数日後 (前年度の反応条件にて求める) 再度定位的に穿刺排液・洗浄。その後前年度求めた条件でプロパゲルマニウムを定位的に局所投与する。そして TMZ を 5 日間経口投与す

る。4 週間目安楽死後脳を摘出、病理固定標本と生標本を採取する。

3) 腫瘍幹細胞休止期駆逐療法の実験モデルの確立と生存率向上の確認

脳腫瘍移植モデルの腫瘍摘出術後一連の実験モデルを作成する。プラスミンを注入し融解後洗浄排出後摘出腔にプロパゲルマニウムを投与。その後テモゾロミド(TMZ)の内服療法を行い、安楽死後病理標本を摘出。細胞駆逐療法が確立していることを確認する。

(1) 長期生存試験として以下 2 群に分ける。

A 群：人工基質にプラスミンを投与する群（コントロール群：従来の細胞吸着療法）

B 群：従来の細胞吸着療法にプロパゲルマニウムを局所投与、TMZ を経口投与する群

上記 2 群は最終治療より 14 日後安楽死させ、治療の有効性を確認する。

(2) 同様の実験にて各群の生存日数の観察と、生存日数を比較観察する。

症例標本の摘出を行い、再発の有無や腫瘍幹細胞の遺残程度を病理学的判定を行い、本実験の有効性の確認を行う。

4. 研究成果

1) In vitro 腫瘍幹細胞休止期駆逐療法の確立

プラスミンで人工基質を融解したのち基底膜を模して作られた ECMatrigel に C6-GFP を入れ 48 時間インキュベートし浸潤モデルを作成した。至適濃度 0.1nmol/ml の AG1478 を ECMatrigel へ投与し、C6-GFP を凝集させる従来の完成モデルを利用した。5 nmol/ml 高濃度プロテオグリカンとフィブリンルーで人工基質を作成、C6-GFP を遊走人工基質に吸着させる。約 1 週間反応させた後、1.0 nmol/ml プラスミンで融解、CCL2 阻害剤（プロパゲルマニウム）を投与。各至適濃度を検討したが 10~100nmol/ml が至適濃度であることが簡易フローサイトメータの G1 レベルで確認された（Fig.1 フローサイト）。

一連の実験で理論どおり、幹細胞が G0 休眠状態から G1 細胞周期へ移行することが確認された。

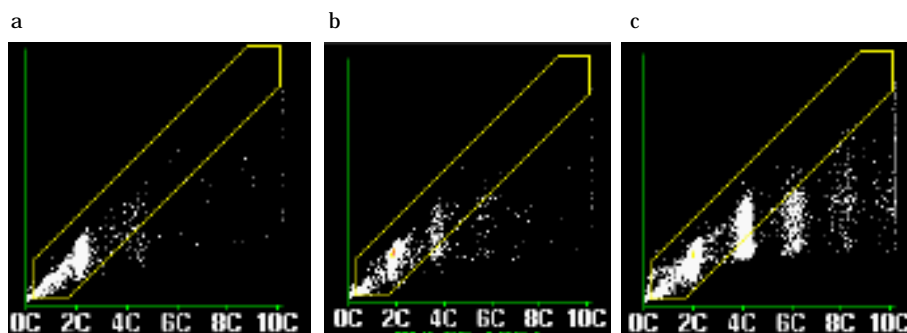


Fig.1a: 1nmol/ml, b: 10nmol/ml, c: 100nmol/ml

2) 動物モデルを用いた腫瘍幹細胞休止期駆逐療法確立

病理標本では CD133 や nestin の検索を行い発現低下が確認されたが、一部 IL2 や IL6 の発現が強く見られ、一部炎症は反応が強くなること示唆され VEGF 発現も強くなる傾向がみられた。この炎症反応をいかに弱く抑えるかという課題が提起された。

In-vivo の実験にて C6 グリオーマ細胞をラット脳内に移植後、摘出を行わず、CCL2 阻害剤の直接注入をおこなった。14 日後移植脳腫瘍の摘出を行った。まず炎症反応の解明を行い、VEGF の発現のみならず腫瘍微小環境について調べ、IL2、IL6、PD-L1、PD-1 炎症性リンパ球の浸潤も強いことがわかった（Fig.2）。

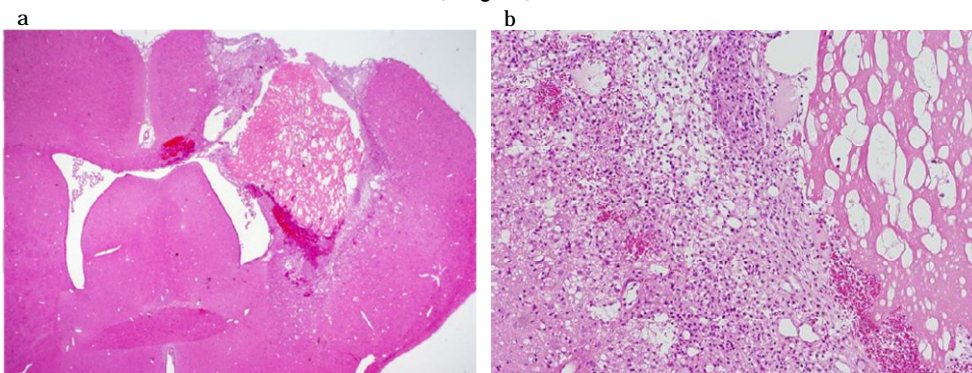
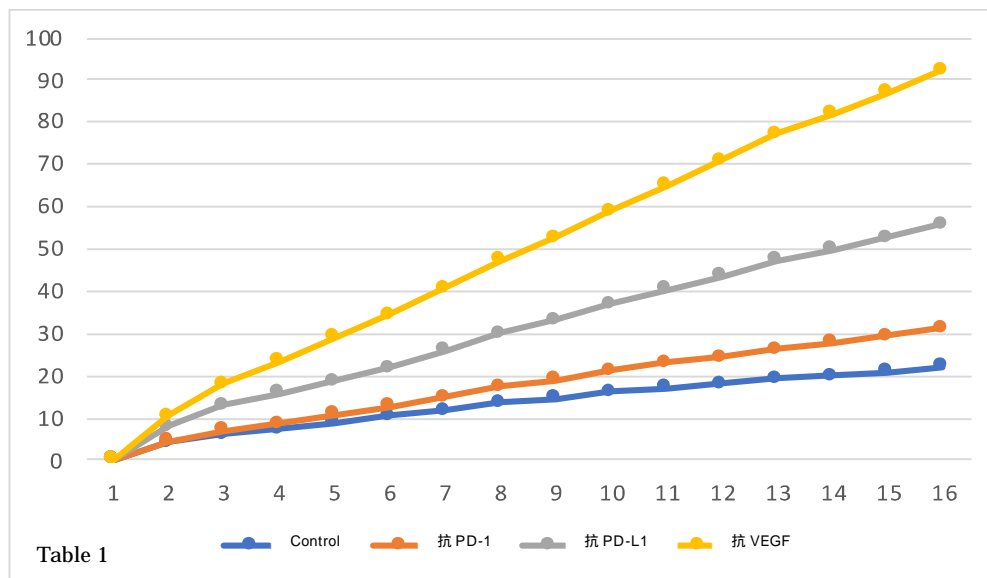


Fig.2 a: X20 低拡大、腫瘍は融解しているが、周辺の炎症反応が強い b: X400 周辺の炎症細胞の浸潤が強い

そのためそのラット移植腫瘍の摘出を用い、抗 VEGF 剤の投与と抗 PD-1 抗体薬、抗 PD-L1

抗体薬の3者を比較した。その後実際の腫瘍モデル、手術モデル、治療モデルを作成した。さらに病理標本を作製し腫瘍細胞の駆逐状態と炎症反応の惹起と脳浮腫を確認した。その後抗 VEGF 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体を投与し、抗 VEGF 抗体の効果が良いことが分かったが、CD133 陽性の腫瘍幹細胞の根治には至っていないことが確認された。特に腫瘍微小環境としての PD-1、PD-L1、PD-L2 陽性の CD-8 陽性 T-cell の発現が強く見られた。

抗 VEGF 薬、抗 PD-1 抗体薬、抗 PD-L1 抗体薬の効果の比較では、抗 VEGF 剤の投与が無難との結果がえられた (Table1)。抗 VEGF 薬が 0.6mM/ml で経済的にも効果的に炎症を抑えることが無難と思われた。その後実際腫瘍モデルを作成し、手術、プラスミン処置を行い CCL2 阻害剤を注入した治療モデルを作成し、ほぼ一定のモデル作成が完成した。しかし病理標本を検討すると、ごくわずかに CD133、nestin 陽性の腫瘍細胞が微小に見られることを確認し、未だ根絶に至っていないことが分かったが TMZ を投与することにより減少傾向にあることが分かった。



3) 腫瘍幹細胞休止期駆逐療法の実験モデルの確立と生存率向上の確認

(1) 全年度の実験で若干炎症性細胞の遺残を認めた。そのため、まず予備実験として抗 VEGF 薬の調整を行った。その後実際の腫瘍モデル、手術モデル、治療モデルを作成した。さらに病理標本を作製し腫瘍細胞の駆逐状態と炎症反応の惹起と脳浮腫を確認した。この脳浮腫に対しては bevacizumab と ramucirumab を比較検討したところ ramucirumab の方が良かったため本薬剤を使用した。

(2) 治療モデル標本を簡易フローサイトメータにて細胞周期を確認したところ、G1 レベルの増加のみならず G2 M 期の増加も見られ、休止期にある幹細胞を駆逐活性化していることを確認した。そのため長期生存実験を行った。コントロール群が従来の CCL2 阻害剤を使用しない群とほぼ同等の 63 日であった。しかし本試験群はコントロール群 (59 日) と比べ延長 (67 日) していたが、従前群と比べて有為差は無かった (Fig. 3)。

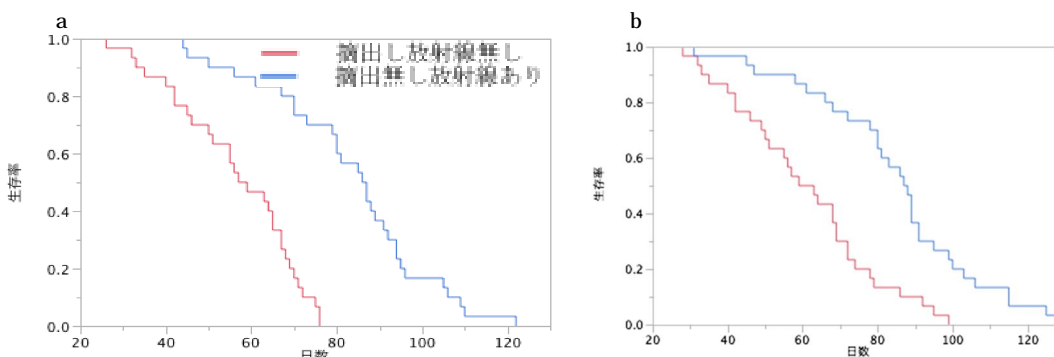


Fig.3 a: 従来実験群(幹細胞駆逐療法なし) b: 赤 コントロール群、青 実験群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅野研一郎, 麓敏雄, 大熊洋揮, 滝澤章央, 黒瀬頭
2. 発表標題 迅速簡易フローサイトメータと術中迅速病理診断との正診率について
3. 学会等名 第30回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------