

## 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28日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591841

研究課題名（和文） グリオーマに対する腫瘍溶解ウイルス療法における血管新生因子  
CYR61の発現影響研究課題名（英文） The effect of CYR61 expression on oncolytic viral treatment for malignant  
glioma

研究代表者

杉生 憲志（SUGIU KENJI）

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：40325105

研究成果の概要（和文）：

我々は悪性グリオーマに対する腫瘍溶解ウイルス（OV）療法についての研究を行ってきた。OV療法をより効果的な治療戦略とするため、腫瘍におけるアンジオトームに関する検討を行ってきたが、血管新生因子 cysteine-rich protein 61 (CYR61)の有意な発現上昇を確認した。CYR61を代表とするアンジオトームのOVに対する影響について検討しながら、現在、新規OVの作製をつづけている。

研究成果の概要（英文）： We are studying oncolytic viral (OV) therapy as a new therapeutic modality for malignant glioma. In OV therapy-induced changes of the several proangiogenic factors, we confirmed the significant, induction of cysteine-rich protein 61 (CYR61) gene expression in tumors treated to OV. We are exploring the influence of angiome such as CYR61 on OV therapy and continue to make new OV.

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	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：悪性グリオーマ、オンコリティックウイルス、CYR61、細胞微小環境、腫瘍血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経腫瘍は原発性脳腫瘍と二次性脳腫瘍と分けられるが、悪性グリオーマは原発性脳腫瘍の中で、最も頻度の高い腫瘍である。手術療法、化学療法、放射線療法を併用しても、予後は極めて不良である。近年、悪性グリオーマに対する治療として、様々な新しい治療法が試みられているが、中でも、変異型ウイルスを用いた遺伝子治

療は近年注目を集めている。腫瘍に対するウイルス療法として、オンコリティックウイルス（腫瘍溶解性ウイルス、OV）を用いた腫瘍溶解療法はウイルスが腫瘍細胞選択的に増殖し、腫瘍細胞を溶解し、しかも正常細胞では増殖能を呈さない。

悪性グリオーマに対し、OVを用いた臨床治験が行われており、比較的安全であることが示されたが、期待していた効果には

至っていない。この OV 療法をさらに効果的な治療モダリティにするために、現在、数々の施設が研究を続けている。

応募者はオハイオ州立大学脳神経外科において、OV をより効果的な治療戦略とするため悪性グリオーマに対するオンコリティックヘルペスウイルス、または、アデノウイルスを用いた宿主の間葉系システムにおける反応、腫瘍のマイクロエンバロメント、さらには、腫瘍血管の変化について調べてきた。我々はラット脳腫瘍モデルにおいて OV-HSV-1 感染後に血管透過性の亢進を認め、その原因を探るべく、我々のラボでは OV 療法における腫瘍から分泌されるアンジオトームについて検討してきたところ、cysteine-rich protein 61(CYR61)の発現が有意に増加しているのを発見した。CYR61 はグリオブラストーマの臨床検体においては 68% (27/40)、また、グリオーマの細胞系列においても強発現している細胞外膜における分泌型ヘパリン結合蛋白である。この発現は乳癌患者やグリオーマ患者の予後における、陰性因子としてのマーカーと考えられている。

CYR61 の発現は腫瘍増殖、血管新生、化学療法に対する抵抗性に関係しているといわれており、そこで、応募者は、腫瘍細胞への OV 感染後 CYR61 の誘導は急速に生じ、CYR61 の発現レベルが増加することによって OV 療法の効果が減弱する可能性がある、と考えた。また、われわれの予備実験では、CYR61 レベルの増加は OV 療法への抵抗性を示し、腫瘍ウイルス抵抗性に導く可能性があることを認めている。また、更なる仮説として、CYR61 の遺伝子発現を制御し、OV の効果を増強させる OV を作製することにより、より効果的な OV 療法ができるのではないか、と着想した。

## 2. 研究の目的

研究目的 1: OV 療法における CYR61 の役割を調べる。HSV-1 だけでなく他のオンコリティックウイルス (アデノウイルス) に対しても調べる。仮説: 細胞微小環境における分泌 CYR61 はウイルスの効果を抑制し、感染が抑えられる。

研究目的 2: CYR61 をターゲットとした short hairpin RNA (SH-RNA) を装備した OV を作製しコントロールウイルスと治療効果を比べ評価する。仮説: CYR61 ターゲットの SH-RNA を発現する OV によって OV の治療効果が増強する。

## 3. 研究の方法

平成 21 年度の計画: 1. オンコリティックウイルスやプラスミドに関して本研究のセットアップを行う。2. In vitro にお

いて、CYR61 を強発現または抑制することにより、OV に対してどのような影響があたえられるかについて検討する。他の OV (他のタイプの HSV-1、アデノウイルス) を使用することにより、同様な結果が得られるか検討する。

平成 22 年度の計画: 1. グリオーマの primary culture を使用することにより、同様な結果を得ることができるか否かについて検討する。2. In vivo において、CYR61 を強発現または抑制することにより、OV に対してどのような影響があたえられるかについて検討する。

平成 23 年度の計画: 1. CYR61 をターゲットとした short hairpin RNA (SH-RNA) を装備した OV を作製する。2. 統計学的データ解析を行い、学会発表・論文投稿する。

## 4. 研究成果

平成 21 年度:

- 1) まず、本研究に使用するオンコリティックウイルスやプラスミドなどのセットアップを行うことができた。
- 2) CYR61 の組み込まれたプラスミドを用い、脳腫瘍細胞株に transfection し、強発現させ、OV に対する感染効率、複製効率への影響について調べたところ、分泌 CYR61 はウイルスの効果を抑制し、感染が抑えられる傾向があった。
- 3) CYR61 に対する siRNA を用い、抑制させることにより、OV に対する感染効率が上昇する傾向が認められた。

平成 22 年度の計画:

- 1) 脳腫瘍患者から承諾を得て採取した primary グリオーマ細胞を用い CYR61 の発現について、QPCR で調べたところ、それぞれの primary グリオーマ細胞において発現の違いがあるものの、OV 感染後に CYR61 の発現上昇が認められた。
- 2) in vitro における CYR61 抗体を用いた OV に対する感染効率、複製効率への影響については、感染効率については CYR61 抗体を使用することにより、抑制される傾向があった。In vivo おいて DIVAA Activation Kit を用いて、腫瘍血管新生に関して評価したところ、発現の高いクローンにおいて腫瘍血管新生の強い傾向が認められた。

平成 23 年度:

- 1) CYR61 の発現を有意に抑えることができる配列の short hairpin RNA (SH-RNA) 装備した OV 作製を試みたが有意な抗腫瘍抑制効果が得られず、現在、再度作製中である。
- 2) In vivo おいて CYR61 を強発現した細胞株でヌードマウスの皮下腫瘍モデルを作

成し、OV を注入したところ、コントロールの細胞株に OV を注入した場合と比べ、有意に腫瘍径が増大していた。今後、生存期間も検討していく予定である。CYR61 をターゲットとした short hairpin RNA (SH-RNA) の作成をつづけ、OV 療法における CYR61 についての研究を今後発展させていくために、平成 24 年度からの課題研究「グリオーマの新規予後因子 CYR61 および MGMT に関する分子生物学的検討」を始めていく予定である。

#### 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 11 件)

1. Computational fluid dynamics of carotid arteries after carotid endarterectomy or carotid artery stenting based on postoperative patient-specific computed tomography angiography and ultrasound flow data Hayase H, Tokunaga K, Nakayama T, Sugiu K, Nishida A, Hishikawa T, Ono S, Ohta M, Date I Neurosurgery 68(4): 1096-1101, 2011 (査読有)
2. Posterior reversible encephalopathy syndrome Yasuhara T, Tokunaga K, Hishikawa T, Ono S, Miyoshi Y, Sugiu K, Date I J Clin Neurosci 18: 406-9, 2011 (査読有)
3. Endovascular coil embolization of a ruptured distal anterior choroidal artery aneurysm associated with ipsilateral middle cerebral artery occlusion: Case report Nishida A, Tokunaga K, Hishikawa T, Sugiu K, Date I Neurologia medico-chirurgica 51(10): 716-719, 2011 (査読有)
4. Determinants of poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage when both clipping and coiling are available: Prospective registry of subarachnoid aneurysms treatment (PRESAT) in Japan PRESAT Group (Sugiu K, Tokunaga K, Nishida A) World Neurosurgery 76(5): 437-445, 2011 (査読有)
5. 脊髄くも膜下出血後 Adamkiewicz 動脈に生じた血管攣縮 三好康之、近藤聡彦、安原隆雄、西田あゆみ、徳永浩司、杉生憲志、伊達 勲 Brain and Nerve 63: 182-183, 2011 (査読有)
6. Effectiveness of intraoperative near-infrared indocyanine green videoangiography in a case with

recurrent spinal perimedullary arteriovenous fistula Miyoshi Y, Yasuhara T, Nishida A, Tokunaga K, Sugiu K, Date I Clinical Neurology and Neuroscience 113: 239-242, 2011 (査読有)

7. Optimal dose of plasmid vascular endothelial growth factor for enhancement of angiogenesis in the rat brain ischemia model Katsumata A, Sugiu K, Tokunaga K, Kusaka N, Watanabe K, Nishida A, Namba K, Hamada H, Nakashima H, Date I Neurologia medico-chirurgica 50(6): 449-455, 2010 (査読有)
8. Percutaneous balloon angioplasty for acute occlusion of intracranial arteries Tokunaga K, Sugiu K, Yoshino K, Terai Y, Imaoka T, Handa A, Hirotsune N, Kusaka N, Date I Neurosurgery 67[ONS Suppl 1]: ons189-197, 2010 (査読有)
9. 細胞移植療法 菊池陽一郎、安原隆雄、伊達 勲、杉生憲志 総合臨床 59(12): 2396-2399, 2010 (査読有)
10. Endovascular treatment for bow hunter's syndrome: case report Sugiu K, Agari T, Tokunaga K, Nishida A, Date I Minim Invas Neurosurg 52: 193-195, 2009 (査読有)
11. Rebleeding from a vertebral artery dissecting aneurysm after endovascular internal trapping: adverse effect of intrathecal urokinase injection or incomplete occlusion?: Case report Sugiu K, Tokunaga K, Ono S, Nishida A, Date I Neurologia medico-chirurgica 49(12): 597-600, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 43 件)

1. 2011 年韓国脳神経血管内科学会学術集会: Seoul, Korea, 2011. 12. 03 Carotid artery stenting: our strategy and results Sugiu K
2. Korean-Japanese Friendship Conference on Neuroendovascular Treatment: Seoul, Korea, 2011. 12. 02 Endovascular treatment of vertebral artery dissecting aneurysms Sugiu K
3. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会: 千葉, 2011. 11. 25 Carotid artery stenting (CAS)における staged angioplasty の有用性 大熊 佑
4. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会: 千葉, 2011. 11. 25 両側椎骨動脈起始部閉塞に合併した破裂右椎骨動脈

- 解離性動脈瘤 豊嶋敦彦
5. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会：千葉，2011.11.25 Davidoff and Schechter 動脈に対する術前塞栓術が有用であった hemangiopericytoma の 1 例 春間 純
  6. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会：千葉，2011.11.25 神経線維腫症に合併した椎骨動静脈瘻の 1 例 大谷理浩
  7. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会：千葉，2011.11.25 無バルーン時代の high flow CCF の治療—皆さん、どうしています？— 杉生憲志
  8. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会：千葉，2011.11.25 Onyx を用いた脳動静脈奇形の塞栓術—臨床的および組織学的検討— 徳永浩司
  9. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会：千葉，2011.11.24 Adjunctive technique を併用した未破裂脳動脈瘤の血管内治療 徳永浩司
  10. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会：千葉，2011.11.24 脳動脈瘤治療における“sheep technique”の有用性 伊丹尚多
  11. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会：千葉，2011.11.24 未破裂脳動脈瘤コイル塞栓術後に出現する発熱、頭痛、消化器症状“post coiling syndrome”の検討 大熊 佑
  12. 第 27 回日本脳神経血管内治療学会学術総会：千葉，2011.11.24 CAS の治療成績向上のために—MRI によるプラーク診断と SPECT による過灌流リスク判定— 杉生憲志
  13. (社)日本脳神経外科学会第 70 回学術総会：横浜，2011.10.13 脳底動脈瘤に対する血管内治療 杉生憲志
  14. (社)日本脳神経外科学会第 70 回学術総会：横浜，2011.10.13 頸動脈狭窄症に対する CAS と CEA の選択と治療成績 徳永浩司
  15. (社)日本脳神経外科学会第 70 回学術総会：横浜，2011.10.13 Carotid artery stenting (CAS) における staged angioplasty の有用性 大熊 佑
  16. 第 20 回中国四国脳神経血管内手術研究会：松江，2011.09.03 脳底動脈 fenestration を伴った椎骨脳底動脈合流部動脈瘤の検討 伊丹尚多
  17. 第 13 回中国四国脳卒中研究会：松江，2011.09.03 脊髄血管病変に対する治療戦略—直達手術と血管内手術の combined approach の有用性— 大熊 佑
  18. 第 36 回日本脳卒中学会総会：STROKE 2011：京都，2011.07.31 未破裂脳動脈瘤コイル塞栓術後に出現する発熱、頭痛、消化器症状の検討—“post coiling syndrome”の検討— 大熊 佑
  19. 第 40 回日本脳卒中の外科学会 (STROKE 2011)：京都，2011.07.31 血栓化動脈瘤に対する血管内治療 杉生憲志
  20. 第 40 回日本脳卒中の外科学会 (STROKE 2011)：京都，2011.07.30 Onyx による術前塞栓術を併用した脳動静脈奇形の外科的摘出術 徳永浩司
  21. 第 10 回日本頸部脳血管治療学会：大阪，2011.06.11 頸動脈狭窄症に対する staged angioplasty 施行の際に stage 間で虚血耐性の変化を認めた一例 大熊 佑
  22. 第 10 回日本頸部脳血管治療学会：大阪，2011.06.10 頸動脈狭窄症に対する CEA と CAS の年齢群別治療成績 徳永浩司
  23. 第 26 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会—CEP—：北九州，2010.11.20 頸動脈ステント留置術の update -2010- 杉生憲志
  24. 第 26 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会：小倉，2010.11.18 未破裂脳動脈瘤コイル塞栓術後に出現する発熱、頭痛、消化器症状の検討—“postcoiling syndrome”の検討— 大熊 佑
  25. 第 26 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会：小倉，2010.11.18 頸動脈狭窄症に対する治療法およびデバイスの選択と治療成績 徳永浩司
  26. (社)日本脳神経外科学会第 69 回学術総会：福岡，2010.10.29 脳底動脈先端部動脈瘤に対するコイル塞栓術 杉生憲志
  27. (社)日本脳神経外科学会第 69 回学術総会：福岡，2010.10.29 脳動脈瘤 (モーニングセミナー) 杉生憲志
  28. (社)日本脳神経外科学会第 69 回学術総会：福岡，2010.10.28 未破裂脳動脈瘤コイル塞栓術後に出現する発熱、頭痛、消化器症状—“postcoiling syndrome”の検討— 大熊 佑
  29. (社)日本脳神経外科学会第 69 回学術総会：福岡，2010.10.28 頸動脈狭窄症に対する内膜剥離術とステント留置術の適応、手術手技および治療成績の検討 徳永浩司
  30. 第 19 回中国四国脳神経血管内手術研究会：岡山，2010.09.11 Vascular reconstruction device (Enterprise) の初期使用経験 伊丹尚多
  31. 第 12 回中国四国脳卒中研究会・第 19 回中国四国脳神経血管内手術研究会：岡山，2010.09.11 急性期頭蓋内動脈閉塞に対するバルーンカテーテルを用いた再開

通療法—岡山大学脳神経外科および関連病院における多施設共同研究の結果から— 徳永浩司

32. 第30回日本脳神経外科コンgres総会：横浜，2010.05.09 CASの手技と注意点 杉生憲志
33. 第30回日本脳神経外科コンgres総会：横浜，2010.05.06 CAS 1 (filter, PTA balloon, stent)—ハンズオンセミナー脳血管内治療コース— 杉生憲志
34. 第9回日本頸部脳血管治療学会学術総会：横浜，2010.04.24 頸動脈狭窄症に対する内膜剥離術とステント留置術の選択と治療成績 徳永浩司
35. 第9回日本頸部脳血管治療学会学術総会：横浜，2010.04.23 フィルター回収に難渋した1例—6Fr カテーテルによる回収法— 大熊 佑
36. 第9回日本頸部脳血管治療学会学術総会：横浜，2010.04.23 CASを安全に行うために—CAS高危険群への対策— 杉生憲志
37. 第25回日本脳神経血管内治療学会総会：富山，2009.11.21 頸動脈ステント留置術—Continuing Education Program— 杉生憲志
38. 第25回日本脳神経血管内治療学会総会：富山，2009.11.20 くも膜下出血で発症した多発性細菌性脳動脈瘤の一例 大熊 佑
39. 第25回日本脳神経血管内治療学会総会：富山，2009.11.19 Cerecyte coilあるいはMatrix2 coilを用いた脳動脈瘤塞栓術の手術手技と治療成績 徳永浩司
40. (社)日本脳神経外科学会第68回学術総会：東京，2009.10.16 頸部内頸動脈ステント内血栓症の対処法 大熊 佑
41. (社)日本脳神経外科学会第68回学術総会：東京，2009.10.16 破裂解離性椎骨動脈瘤に対する急性期治療 杉生憲志
42. 第11回中国四国脳卒中研究会：高知，2009.09.12 頸動脈狭窄症に対する外科的治療—頸動脈ステント認可後の動向—大熊 佑
43. 第18回中国四国脳神経血管内手術研究会：高知，2009.09.11 Conus medullaris arteriovenous malformation (AVM)の1例—直達手術と血管内手術のcombined approachの有用性— 大熊 佑

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉生 憲志 (SUGIU KENJI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：40325105

### (2) 研究分担者

黒住 和彦 (KUROZUMI KAZUHIKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20509608

### (3) 連携研究者

伊達 勲 (DATE ISAO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70236785