

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 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790398

研究課題名（和文）ヒト脳腫瘍を病理組織学的に反映したマウスモデルの開発と応用

研究課題名（英文）Development of brain tumor mouse models reflecting human counterparts

研究代表者

百田 洋之 (MOMOTA HIROYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：60469971

研究成果の概要（和文）：RCAS/tv-a システムと呼ばれる脳腫瘍マウスモデルを国内で初めて使用し、PDGFB 遺伝子導入による悪性神経膠腫と、Shh 遺伝子導入による髄芽腫の作成に成功した。また、Shh と p53 short hairpin の遺伝子導入による髄芽腫や、c-Myc の遺伝子導入による新しい髄芽腫マウスモデルも作成し、現在解析中である。さらに、新たな脳内注射法による脳腫瘍作成方法を開発し、脳神経外科専門誌に発表した (J Neurosurg. 2012. 116:630-635)。これらの成果は、稀少な脳腫瘍に対する有効な治療薬の開発と発生機序の解明に貢献できると思われる。

研究成果の概要（英文）：We have successfully established PDGFB-induced malignant glioma and Shh-induced medulloblastoma mouse models by using RCAS/tv-a system. These are the first brain tumor mouse models created by RCAS/tv-a system in Japan. We have also developed novel mouse models of medulloblastoma by using RCAS-p53 short hairpin or RCAS-c-Myc. A novel method of intracranial injection for brain tumor mouse models is invented by the support of this grant and has been published (J Neurosurg. 2012. 116:630-635).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：脳神経外科学、癌生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌、応用動物、病理学、脳神経疾患、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍は小児癌の中では白血病について 2 番目に多く、死亡率の高い病気である。髄芽腫 (medulloblastoma: MB) は、その小児脳腫瘍の約 25% を占める代表的な小脳の腫瘍であり¹、最近の医学の発達によって 5 年生存率は 70% 近くまで改善したが、まとまった症例数を得ることが難しいために大規模な臨床試験が組めず、標準治療が確立されてい

ない。また、放射線治療を行った小児髄芽腫例では、知能低下や発達遅滞などの後遺症が高頻度に見られるため、いかに有効な化学療法を開発するかが緊急性のある課題となっている。

近年、遺伝子改変マウス (genetically engineered mouse: GEM) が開発され、そのマウスを使ってヒトに対する有効な薬剤や治療法が試されるようになった。GEM ではヒ

トと同じ遺伝子変異を人工的に作成し、ヒトと同じ病気を再現できるため、臨床試験を行う前段階での動物実験（前臨床試験）において大変有用である。これまでの癌研究における動物モデルの主流は、ヌードマウスを用いる移植モデルであったが、免疫機能の異常な動物に対して他の動物の培養細胞株を移植するモデルは、ヒトの腫瘍を反映しているとは言えなかった。これに対し、GEMを用いたマウスモデルでは、本来腫瘍が発生する部位から、ヒトと同じ遺伝子異常を介して腫瘍が発生するため、遺伝学的、組織学的にヒトの腫瘍を正確に反映した動物モデルであると言える²。

GEMを用いた遺伝・組織学的に正確な脳腫瘍のマウスモデルは、最初に神経膠腫（glioma）で開発された³。このモデルは、神経膠腫を発生する神経膠細胞にのみ受容体（tv-a）を発現するGEMを作り、この細胞にがん遺伝子を組み込んだレトロウイルス（RCAS）を感染させ、体細胞遺伝子導入により発癌させる。神経膠細胞に特異的に発現しているglial fibrillary acidic protein（GFAP）とnestinのプロモーターによってレトロウイルスの受容体が発現するようなマウス（Gtv-a, Ntv-a）を作り、これにヒトの神経膠腫で高発現している癌遺伝子platelet derived growth factor（PDGF）を組み込んだレトロウイルス（RCAS-PDGF）を感染させると、マウスに神経膠腫が発生する⁴。また、ヒト髄芽腫で活性化しているsonic hedgehog（Shh）を組み込んだレトロウイルス（RCAS-Shh）を感染させると、マウスに髄芽腫が発生する⁵。このような受容体を発現するGEMと癌遺伝子を組み込んだレトロウイルスによる発癌システムを、RCAS/tv-aシステムという。

最近、研究代表者は、このRCAS/tv-aシステムを用いて、ヒト髄芽腫で知られている遺伝子異常を導入し、マウスにprimitive neuroectodermal tumor（PNET）とlarge cell/anaplastic MB（LC/A MB）を発生させることに成功した⁶。このモデルは、p53ノックアウトマウスとGtv-aマウスを交雑させたp53^{-/-} Gtv-aマウスを用いて、RCAS-c-MycとRCAS-β-cateninを感染させることによって得られた。LC/A MBは髄芽腫の20%程度を占めると言われており、RCAS-Shhを用いた古典的髄芽腫モデルを合わせると、髄芽腫の大部分をカバーできる。しかし、LC/A MBモデルはまだ作成過程であり、モデルの最適化と効率化を図らなければならない。

参考文献

1. Packer RJ. Brain Dev 1999; 21: 75-81
2. Frese KK and Tuveson DA. Nat Rev Cancer 2007; 7: 645-658
3. Holland EC, Hively WP, DePinho RA, Varmus

HE. Genes Dev 1998; 12: 3675-3685

4. Dai C, Celestino JC, Okada Y, Louis DN, Fuller GN, Holland EC. Genes Dev 2001; 15: 1913-1925
5. Rao G, Pedone CA, Coffin CM, Holland EC, Fults DW. Neoplasia 2003; 5: 198-204
6. Momota H, Shih AH, Edgar MA, Holland EC. Oncogene 2008; 27: 4392-4401.

2. 研究の目的

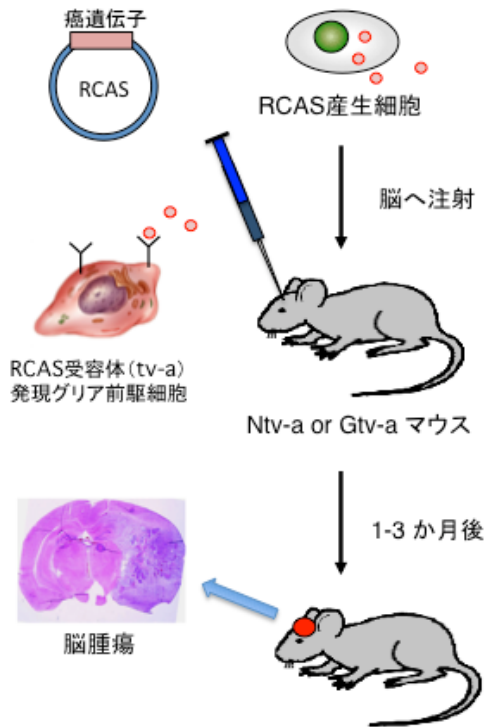
LC/A MBとPNETは稀な小児悪性脳腫瘍であり、ヒトでの臨床試験が困難であるため、ヒトの腫瘍を正確に反映した動物モデルを使って治療法を開発しなければならない。本研究の目的は、治療法の確立していない髄芽腫やPNETに対し、マウスモデルを確立し、有効な治療法を見出すことである。長期的な目標は、稀少な脳腫瘍に対するマウスモデルを用いて前臨床試験を行うことと、これらの腫瘍の発生機構を分子生物学的に解明することである。

3. 研究の方法

- (1) 遺伝子改変マウスと組替え DNA 実験のための書類作成：RCAS/tv-aシステムは、遺伝子改変マウス（tv-aマウス）にレトロウイルス（RCAS）を感染させて遺伝子導入を行うため、大臣確認や施設内の組換えDNA実験等の申請書類を作成する。
- (2) 遺伝子改変マウスの作成とマウスの交配・飼育：RCAS/tv-aシステムに必要な遺伝子改変マウス（Gtv-a, Ntv-a）は、アメリカから輸入し、動物実験施設（P2A）で飼育する。これらのマウスにp53欠損等の背景を持つマウスを交配し、新たな遺伝子改変マウスを作成する。
- (3) レトロウイルスベクターの作成：癌遺伝子を組込んだベクター（RCAS-c-Myc, RCAS-Shh, RCAS-PDGFBなど）を作成または輸入する。ベクターはアメリカのHolland研究室から入手し、癌遺伝子は必要に応じてクローニングしてベクターに組み込む。
- (4) ウイルス産生細胞の作成：ウイルス産生細胞としてニワトリ線維芽細胞（DF-1）を使用する。DF-1は、ATCCから購入し、癌遺伝子を組み込んだRCASをリポフェクション法で遺伝子導入する。
- (5) DF-1細胞のマウス脳への注入：RCAS産生DF-1細胞を遠心分離して注射器に取り、生後48時間以内のマウス脳内へ1-2mL直接注入する。
- (6) 脳腫瘍発生マウスの観察：脳腫瘍の発生したマウスを外観や活動性により察知し、マウスが病死する直前に安楽死させ、腫瘍

を抽出する。腫瘍発生率は30-90%程度であり、観察期間は4-12週である。

- (7) **腫瘍標本の作製と解析**: 抽出した脳組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋して、H&E染色を行い観察する。導入した遺伝子が発現されているかどうかを、免疫染色やPCR法などで解析する。
- (8) **マウスモデルの最適化**: 導入する遺伝子の種類や量、導入時期などを検討し、腫瘍発生効率が高く正確なモデルを作成する。
- (9) **新たなモデルの開発**: 新たな癌遺伝子やマウス背景を用いて、新しい脳腫瘍モデルの開発に取り組む。
- (10) **薬剤スクリーニングと前臨床試験**: 抗癌剤や分子標的薬を、培養細胞を用いてMTTアッセイ等でスクリーニングし、有効な薬剤は脳腫瘍マウスモデルを用いて前臨床試験を行う。

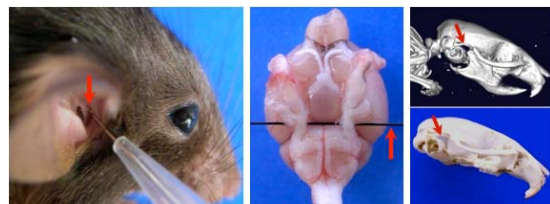
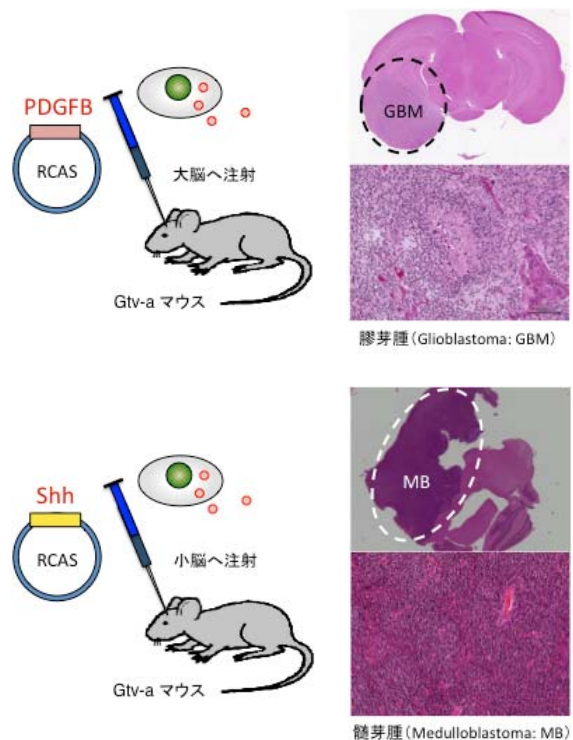


4. 研究成果

- (1) PDGFB 遺伝子導入による悪性神経膠腫 (glioma) と、Shh 遺伝子導入による髄芽腫 (MB) の作成に成功した。これらは海外で既に作成されているマウスモデルであるが、日本で初めての RCAS/tv-a システムによる脳腫瘍モデルであった。腫瘍の H&E 標本作製と免疫染色による確認を行った他、primary culture の細胞株も樹立し解析した。ラマン分光法による解析にも着手した。これらの結果は、2011 年の日本癌学会や日本脳腫瘍学会で発表された。
- (2) 新たなマウスモデルとして、c-Myc などの癌遺伝子を用いた髄芽腫マウスモデル

の作成を行い、Shh と p53 short hairpin の遺伝子導入による髄芽腫のマウスモデルを世界で初めて作成した。c-Myc の遺伝子導入による髄芽腫マウスモデルも 1 例だけだができており、現在解析中である。また、4 週齢のマウスにおいて、新たな脳内注射法を開発して脳腫瘍を作成し、この結果を脳神経外科専門誌に発表した (J Neurosurg. 2012. 116:630-635)。

- (3) マウス脳腫瘍モデルを用いた前臨床試験は、temozolomide、perifosin などの新薬を含めた抗がん剤を用いて計画中的である。薬剤の入手は完了したが、新規の髄芽腫マウスモデルの完成が遅れたため、今後開始する予定である。これらのモデルを使用した前臨床試験により、悪性神経膠腫に対する有効な治療薬の開発を行うことが期待される。また、髄芽腫と PNET の新たなマウスモデルは、世界で初めてのモデルであり、これらの稀少な脳腫瘍に対する治療法の開発と発生機序の解明に貢献できると思われる。



新たな脳内注射法 (J Neurosurg. 2012. 116:630-635)

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 Ohka F, Natsume A, Motomura K, Kishida Y, Kondo Y, Abe T, Nakasu Y, Namba H, Wakai K, Fukui T, Momota H, Iwami K, Kinjo S, Ito M, Fujii M, Wakabayashi T, The Global DNA Methylation Surrogate LINE-1 Methylation Is Correlated with MGMT Promoter Methylation and Is a Better Prognostic Factor for Glioma, PLoS One, 査読有、Vol.6, 2011, e23332
- ② Motomura K, Natsume A, Fujii M, Ito M, Momota H, Wakabayashi T, Long-term survival in patients with newly diagnosed primary central nervous system lymphoma treated with dexamethasone, etoposide, ifosfamide and carboplatin chemotherapy and whole-brain radiation therapy, Leuk Lymphoma, 査読有、Vol.52, No.11, 2011, 2069-2075
- ③ Iwami K, Momota H, Natsume A, Kinjo S, Nagatani T, Wakabayashi T, A novel method of intracranial injection via postglenoid foramen for brain tumor mouse models, J Neurosurg, 査読有、Vol.116, No.3, 2011, pp.630-635
- ④ Momota H, Iwami K, Fujii M, Motomura K, Natsume A, Ogino J, Hasegawa T, Wakabayashi T, Rhabdoid glioblastoma in a child: case report and literature review, Brain Tumor Pathol, 査読有、Vol.28, No.1, 2011, pp.65-70
- ⑤ Momota H, Narita Y, Matsushita Y, Miyakita Y, Shibui S, p53 abnormality and tumor invasion in patients with malignant astrocytoma, Brain Tumor Pathol, 査読有、Vol.27, No.2, 2010, pp.95-101
- ⑥ Suzuki K, Momota H, Tonooka A, Noguchi H, Yamamoto K, Wanibuchi M, Minamida Y, Hasegawa T, Houkin K, Glioblastoma simultaneously present with adjacent meningioma: case report and review of the literature, J Neurooncol, 査読有、Vol.99, No.1, 2010, pp.147-153
- ⑦ Momota H, Narita Y, Miyakita Y, Hosono A, Makimoto A, Shibui S, Acute lymphoblastic leukemia after temozolomide treatment for anaplastic astrocytoma in a child with a germline TP53 mutation, Pediatr Blood Cancer, 査読有、Vol.55, No.3, 2010, pp.577-579
- ⑧ Momota H, Narita Y, Maeshima AM, Miyakita Y, Shinomiya A, Maruyama T, Muragaki Y, Shibui S, Prognostic value of immunohistochemical profile and response to high-dose methotrexate therapy in primary CNS lymphoma, J Neurooncol, 査読有、Vol.98, No.3, 2010, pp.341-318

- ⑨ 成田善孝、宮北康二、百田洋之、宮原るり子、渋井壮一郎、悪性神経膠腫患者に対する告知・終末期医療の現状報告—日本脳腫瘍学会員へのアンケート調査報告、脳神経外科、Vol.37, No.10, 2009, pp.973-981
- ⑩ Brennan C, Momota H (co-first author), Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E, Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations, PLoS One, 査読有、Vol.4, 2009, e7752
- ⑪ Momota H, Holland EC, Mouse models of CNS embryonal tumors, Brain Tumor Pathol, 査読有、Vol.26, No.2, 2009, pp. 43-50

[学会発表] (計 19 件)

- ① 百田 洋之, 他、ヒト脳腫瘍の分子異常を反映したマウスモデルの開発、ポスター、第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、下呂温泉 水明館 (岐阜)
- ② 百田 洋之, 他、放射線治療の強度を落とし晩期合併症の軽減を目指した大量化学療法による小児 CNS embryonal tumor の治療成績、口演、第 70 回社団法人日本脳神経外科学会学術集会、2011 年 10 月 12 日、パシフィコ横浜 (神奈川)
- ③ Momota H, 他、Development of novel mouse models of medulloblastomas using the RCAS/tv-a gene transfer system, 口演、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋国際会議場 (愛知)
- ④ Momota H, PCNSL Basic Science Studies, 招待講演、2011 Pan Pacific Lymphoma Conference, 2011 年 8 月 15 日、Grand Hyatt Kauai Resort & Spa (Koloa, HI, USA)
- ⑤ 百田 洋之, 他、著明な pseudoprogression を示した小児視床部悪性神経膠腫の 1 例、口演、第 29 回脳腫瘍病理学会、2011 年 5 月 21 日、タワーホール船堀 (東京)
- ⑥ Kinjo S, Momota H, 他、Developing novel mouse model of medulloblastoma reflecting molecular abnormalities and histologic features, 口演、第 3 回 NAGOYA グローバルリトリート、2011 年 2 月 25 日、愛知健康プラザ (愛知)
- ⑦ 百田 洋之, 他、膠芽腫におけるタンパク異常発現パターンの解析、ポスター、第 28 回日本脳腫瘍学会、2010 年 11 月 28 日、軽井沢プリンスホテルウエスト (長野)
- ⑧ 百田 洋之, 他、小児の CNS embryonal tumor に対する末梢血幹細胞移植を用いた放射線化学療法の治療成績、口演、第 69 回社団法人日本脳神経外科学会学術集会、2010 年 10 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡)
- ⑨ 百田 洋之, 他、小児に発生した視床部神

経膠腫の1例、口演、第29回東海脳腫瘍病理検討会、2010年9月11日、TKP名古屋ビジネスセンター（愛知）

- ⑩ Momota H, 他、Secondary hematological malignancies associated with temozolomide (TMZ) in patients with glioma、46th American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting、ポスター、2010年6月6日、McCormick Place (Chicago, IL, USA)
- ⑪ 百田 洋之、他、Rhabdoid glioblastoma の一例と rhabdoid component を持つ星細胞系腫瘍の文献的考察、第28回脳腫瘍病理学会、口演、2010年5月22日、大阪市中央公会堂（大阪）
- ⑫ 百田洋之、Bioluminescence imaging の原理とマウスモデルへの応用、NAGOYA Global Retreat、招待講演、2010年2月26日、愛知健康プラザ（愛知）
- ⑬ Momota H, 他、NAGOYA Global Retreat、Glioblastoma subclasses defined by signal transduction pathway activity、口演、2010年2月26日、愛知健康プラザ（愛知）
- ⑭ Momota H, 他、Mouse models for brain tumors グローバル COE 第2回国際シンポジウム、ポスター、2009年11月26日、名古屋ヒルトンホテル（愛知）
- ⑮ 百田 洋之、他、再発悪性神経膠腫に対する Temozolomide 7-days-on/7-days-off 療法、第27回日本脳腫瘍学会、口演、2009年11月8日、全日空ゲートタワーホテル大阪（大阪）
- ⑯ Momota H、Signal transduction and mouse models of brain tumors、Swiss-Japanese Neurosurgical Joint Meeting 2009、口演、2009年7月24日、Sorell Hotel Zürichberg (Zürich, Switzerland)
- ⑰ Momota H, 他、Expression and prognostic significance of differentiation markers in primary CNS lymphoma (PCNSL)、45th American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting、Publication only、2009年5月29日、Orange Country Convention Center (Orlando, FL, USA)
- ⑱ Momota H, 他、Mouse models of CNS embryonal tumors、The 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology、口演、2009年5月14日、パシフィコ横浜（横浜）
- ⑲ 百田 洋之、他、悪性星細胞腫における浸潤能と p53 変異の解析、第27回脳腫瘍病理学会、口演、2009年5月8日、アクロス福岡（福岡）

〔図書〕（計1件）

- ① 百田洋之、他、医学書院、がん診療レジデントマニュアル第5版「脳腫瘍」、2010、292-300

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百田 洋之 (MOMOTA HIROYUKI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：60469971

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし