

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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791332

研究課題名（和文） 遺伝子修飾した血管内皮前駆細胞（EPC）によるワクチン療法の開発

研究課題名（英文） Vaccine therapy using EPC with gene modification

研究代表者

石川 栄一（ISHIKAWA EIICHI）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30510169

研究成果の概要（和文）：近年、治療抵抗性を保持するグリオーマ幹細胞や腫瘍血管内皮（前駆）細胞が、治療ターゲットとして注目を集めている。今回はこの血管内皮（前駆）細胞もしくはその関連分子を標的とした治療を行うべく、実験を行った。まずマウス血管内皮細胞の cell-line（F2）を用いて実験を行った。F2 と組織内の EPC との差異を確認したところ、比較的類似した性質を有していることが判明した。次に、F2 ワクチンを行った群と行わなかった群あるいは F2 ワクチンとグリオーマワクチンの併用群で、皮下腫瘍の増殖や腫瘍組織内の血管内皮の数などについて検討した。結果として、予防的投与における併用群が最も腫瘍増殖抑制効果を示した。次に、マウスグリオーマ幹細胞を使用することとした。血管内皮関連分子の一つである CXCR4 が、グリオーマ幹細胞（TS-G）で有意に発現していた。また、培養条件により CXCR4 のリガンドである SDF-1 の発現が増強し、血管内皮（前駆）細胞様に変化することが分かった。SDF-1/CXCR4 阻害剤や siRNA を用いて実験を行うと、濃度依存的に細胞増殖が抑制された。また、*vivo* においても SDF-1 の阻害は腫瘍増殖抑制効果をもたらした。以上より、血管内皮細胞関連分子である SDF-1 がグリオーマ幹細胞の増殖や分化に影響を与えることが示された。

Various types of endothelial cell-targeting therapies have been developed today. The present study investigated the effect of combined vaccine from glioma cells (GL261) and endothelial cells (F-2). Tumor growth was inhibited after preventive use of the combined vaccine, prepared from GL261 and F-2 cells. Next, we investigated endothelial cell-targeting therapies using glioma initiating cells (TSG). TSG cells highly expressed CXCR4. Under specific culture condition of the glioma-initiating cells the cell morphology including high expression of CXCL12. CXCL12/CXCR-4 blockage by AMD 3100 or siRNA markedly inhibited the cell proliferation in a concentration-dependent manner. In *vivo* model, CXCL12 knockdown by shRNA inhibited the tumor growth. These results indicate that CXCL12 of glioma initiating cells is one of key molecules to mediate tumor growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：脳神経外科学

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：血管内皮前駆細胞、免疫学、脳神経疾患、悪性脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍を含む多くのがんが、単独の治療のみでは治療抵抗性であり、現状では手術、放射線療法等に加え、化学療法、分子標的療法などが行われている。さて、近年各臓器の形成に幹細胞が重要な役割を担うことが明らかとなっているが、悪性脳腫瘍においても腫瘍幹細胞や腫瘍内皮幹（前駆）細胞（腫瘍EPC）が存在し、腫瘍・内皮細胞の増殖・構築に重要な役割をしていることが推測されてきている。一方で、一部の癌において血液に循環する血管内皮前駆細胞（EPC）が腫瘍組織に移動しうるのみならず、腫瘍血管新生に深く関わっていることが示唆されている。血中EPCと腫瘍の進行との関連や、遺伝子修飾したEPC投与による腫瘍血管新生の機序の研究などもある。腫瘍EPCと血中EPCとが比較的近い存在であることも示唆されている。脳腫瘍の内皮細胞を標的とした基礎・臨床研究（血管新生抑制療法）は、既にVEGF抗体療法を中心に盛んであるが、腫瘍EPCを血管新生抑制療法として用いた報告はほとんど無い。腫瘍血管内皮細胞や培養内皮細胞をワクチンとして使用した研究は存在するが、動物実験レベルで担腫瘍マウスへの効果を見たものなど報告は少なく、大腸がんやメラノーマなどの脳腫瘍以外の腫瘍での実験がほとんどである。

2. 研究の目的

そこで我々は、マウスグリオーマモデルで、同種の血管内皮細胞ワクチンでも腫瘍血管内皮特異的な免疫応答が誘導できることを確認することとした。さらに従来の腫瘍を標的としたワクチンと腫瘍血管内皮細胞を標的としたワクチンの併用により腫瘍制御効果が高まると考え、実験を計画した。

3. 研究の方法

6週齢C57BL/6Jマウスマウスにグリオーマ細胞株、GL261を接種し皮下腫瘍の成長と腫瘍組織の傾向を確認するためのモデル

を作成した。このモデルを用いて、腫瘍組織の免疫染色や脾細胞の免疫学的評価を行った。

4. 研究成果

実験1 腫瘍細胞単独ワクチンと血管内皮を含んだ腫瘍組織ワクチンの比較：GL261腫瘍細胞ワクチンと、GL261皮下腫瘍組織の全細胞を用いたワクチンを投与し、GL261皮下腫瘍モデルの腫瘍体積を比較した。最終日の体積はそれぞれ非ワクチン群（control） $4,656 \pm 1,254 \text{ mm}^3$ 、腫瘍細胞ワクチン群（GL261） $3,111 \pm 807 \text{ mm}^3$ 、腫瘍血管内皮細胞を含む全細胞ワクチン群（Whole cells） $2,343 \pm 788 \text{ mm}^3$ であった。Whole cellsワクチン群は他の群に比べやや腫瘍体積が抑制された結果であった。

実験2 ELISpot assayによるワクチン投与後の免疫応答：ELISpot assayの結果、F-2ワクチンを接種した場合、F-2細胞溶解液と再刺激させると、再刺激しないものと比べ有意に高いIFN- γ 産生細胞が検出された。すなわちF-2ワクチン投与により血管内皮細胞であるF-2特異的な免疫誘導がおこなわれている結果であった。F-2で高度に発現しているVEGF-R2ペプチドを再刺激抗原として使用した場合も、F-2ワクチンと同様に非ワクチン群と比べ有意にIFN- γ 産生細胞が検出された。

実験3 腫瘍血管内皮ワクチン併用実験：GL261腫瘍細胞ワクチンと、GL261とTpit/E混合ワクチン、GL261とF-2混合ワクチンを投与し、GL261皮下腫瘍モデルの腫瘍体積を比較した結果、最終日の体積はそれぞれ非ワクチン群（control） $4,251 \pm 832 \text{ mm}^3$ 、GL261ワクチン群（GL261） $1,675 \pm 867 \text{ mm}^3$ 、GL261+Tpit/Eワクチン群（GL261+Tpit/E） $1,109 \pm 372 \text{ mm}^3$ 、GL261+Tpit/Eワクチン群（GL261+F-2） $166 \pm 18 \text{ mm}^3$ であった。GL261とF-2の混合ワクチン群は有意に腫瘍増殖が抑制された。

実験4 therapeutic study による組織内腫瘍血管の評価: Therapeutic study による各ワクチン間の組織を比較した。このときの腫瘍体積は非ワクチン群 $418.9 \pm 75.3 \text{ mm}^3$ 、GL261 ワクチン群 $396.7 \pm 52.7 \text{ mm}^3$ 、F-2 ワクチン群 $499.2 \pm 88.0 \text{ mm}^3$ 、GL261 と F-2 混合ワクチン群 (GL261+F-2) $320.1 \pm 27.1 \text{ mm}^3$ 、であり、体積の有意差はない。この病理標本を vWF 免疫染色し確認すると、平均血管数はそれぞれ非ワクチン群 49.7 ± 4.1 、GL261 ワクチン群 20.7 ± 4.4 、F-2 ワクチン群 13.0 ± 0.5 、GL261 と F-2 混合ワクチン群 11.7 ± 2.6 、であり混合ワクチン群で最も少ない結果であった。また、非ワクチン群と GL261 ワクチン群の組織切片の多くの範囲では腫瘍組織内に細かい血管新生を認めるのに対し、F-2 ワクチン群と GL261 と F-2 の混合ワクチン群では大型の血管は認めるもの、小型の血管は減少しているという所見だった。

以上のように、グリオーマ腫瘍細胞と血管内皮細胞からの混合ワクチン治療は、マウス皮下腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖を抑制した。さらに腫瘍組織中の新生腫瘍血管数は、内皮細胞ワクチンおよび混合ワクチン治療群で減少していた。グリオーマに対する免疫治療において、腫瘍ワクチンに血管内皮細胞ワクチンを併用することは新しい治療戦略となりうると考えた。

実験5: 次に、これまでの実験1-4とは内容が異なるが、マウスグリオーマ幹細胞を使用し、腫瘍血管内皮細胞関連分子を標的とした治療法を開発することとした。他大学からグリオーマ幹細胞の TS-G 細胞を提供いただき、当研究室での vitro 実験に使用できるか、培養・継代等の初期実験を行った。グリオーマ幹細胞 (TS-G 細胞) とグリオーマ細胞 (GL261 細胞) には血管新生関連の分子に発現の差異があるという仮説を実証すべく、TS-G 細胞と GL261 細胞について、RT-PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。結果として、GL261 ではほとんど発現の見られなかった血管内皮関連分子の

一つである CXCR4 が、TS-G では発現していた。また、TS-G において、血管内皮 (前駆) 細胞用の培地で培養することにより、CXCR4 のリガンドである SDF-1 の発現が増強し、血管内皮 (前駆) 細胞様に変化することが分かった。グリオーマ幹細胞は、SDF-1 の阻害によって増殖抑制されるという仮説を検証すべく、SDF-1/CXCR4 阻害剤である AMD3100 や SiRNA を用いて実験を行った。TS-G 細胞では濃度依存的に細胞増殖が抑制された。また、vivo においても SDF-1 の阻害は腫瘍増殖抑制効果をもたらした。以上より、血管内皮細胞関連分子である SDF-1 がグリオーマ幹細胞の増殖や分化に影響を与えることが示された。本研究期間終了後も本研究を継続していく。

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1件)

1. Sakamoto N, Uemae Y, Ishikawa E, Takano S, Nakai K, Yamamoto T, Zaboronok A, Matsumura A. Glioma Immunotherapy With Combined Autologous Tumor Cell and Endothelial Cell Vaccine In Vivo. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2012, ;52(4):194-201 査読有

[学会発表] (計9件)

1. 石川栄一、上前洋二、松田真秀、大須賀覚、山本哲哉、高野晋吾、松村 明. 悪性神経膠腫瘍に対する SDF-1 (CXCL-12) /CXCR-4 を標的とした新規治療の開発. 第8回脳腫瘍の基礎シンポジウム 東京 2013.3.2
2. 石川栄一、上前洋二、大須賀覚、松田真秀、坂本規影、高野晋吾、中井啓、山本哲哉、松村 明: マウス Brain Tumor-initiating Cell-line (BTICs) を用いた分子標的療法の開発. 第30回日本脳腫瘍学会学術集会 2012.11.25-27(広島)
3. Uemae Y, Ishikawa E, Osuka S, Matsuda M, Sakamoto N, Takano S, Nakai K,

Yamamoto T, Saya H, Matsumura A: CXCL12 Targeting Therapy for Glioma Using a Murine Brain Tumor-Initiating Cell-line The 3rd Leading Graduate Schools International Conference, 2012. 11. 1-2 (Tsukuba)

4. 松田真秀、小沼邦之、石川栄一、金田安史、松村明：不活化ウイルス粒子による悪性脳腫瘍治療の開発－免疫療法としての側面－ 第9回がんワクチン療法研究会 (AsCaVaTh) 学術集会 2012. 11. 17 (つくば)
5. 松田真秀、金田安史、石川栄一、中井啓、山本哲哉、高野晋吾、松村明：ウイルスエンベロープを用いた drug delivery system の開発. 第70回日本脳神経外科学会総会 2011. 10. 12-14 (横浜)
6. 石川栄一、坂本規彰、上前洋二、山本哲哉、高野晋吾、松村明 マウスグリオーマ皮下モデルを用いた同種血管内皮細胞ワクチン療法の研究、第28回脳腫瘍学会、2010. 11. 28-30(軽井沢)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 栄一 (ISHIKAWA EIICHI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30510169

(2) 研究協力者

坂本 規彰

Department of Neuropathology,

University of Bonn, Germany (留学生)

上前 洋二

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

大学院生

松田 真秀

筑波大学・附属病院・病院講師