

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：27501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659689

研究課題名(和文) 悪性グリオーマに対する血管内皮前駆細胞を利用した自家細胞療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach for malignant glioma using endothelial progenitor cell.

研究代表者

中林 博道 (HIROMICHI, NAKABAYASHI)

大分県立看護科学大学・看護学部・教授

研究者番号：70346716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell:EPC)は末梢血管からの投与にて血液脳関門を越え脳腫瘍へ遊走するという特性を持つ。腫瘍細胞をアポトーシスへ誘導するTumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を利用して悪性グリオーマの治療目的にEPCを遺伝子学的あるいは細胞表面修飾的に細胞改変することを試みた。その結果、細胞改変されたEPCがin vitroならびにin vivoにおいてヒト悪性グリオーマ細胞をアポトーシスへ誘導することが示された。

研究成果の概要(英文)：Due to their unique property to cross the blood-brain barrier and to migrate to pathological lesions, endothelial progenitor cell (EPC) is expected as a new therapeutic tool for malignant glioma. EPCs were genetically modified by using tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the first approach. On the other hand, the surface of EPC was modified by using avidin-biotin system and TRAIL protein. Modified EPCs were proved to be effective to induce the apoptosis of malignant glioma cells.

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

キーワード：悪性グリオーマ 血管内皮前駆細胞 TRAIL avidin-biotin system

### 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは高い増殖能・浸潤能を持つ予後不良の腫瘍で、そのうち最も悪性度が高く頻度も多いグリオブラストーマはヒト腫瘍の中でも最も治療が困難な腫瘍の一つである。これは、腫瘍の高い悪性度のためだけでなく、腫瘍が周囲の正常脳組織の中を神経線維に沿って広く浸潤するため腫瘍の全摘出が不可能なこと、血液脳関門のため薬剤の移行率が低いこと、また遅発性神経放射線障害の危険性から放射線治療にも照射量の限界があることなど、中枢神経系の特殊性も関係している。近年、本邦においても導入された temozolomide をもってしてもグリオブラストーマ患者の平均生存期間を導入以前に比べ 2.5 か月程度延長させたに過ぎず、現在においても平均生存中央値は約 1 年、5 年生存率は約 8%にとどまっている。こうした状況から悪性グリオーマに対する新たな治療法の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

近年、心臓などの虚血性疾患に対する血管新生への応用で脚光を浴びている血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) が腫瘍血管の新生にも関与することが示された。悪性グリオーマは血管新生が極めて旺盛な腫瘍であることから、腫瘍の新生血管部へ EPC が動員されるということを利用すれば、EPC も悪性グリオーマに対する細胞療法を担える可能性があると考えられる。さらに EPC は骨髄内だけでなく末梢血中にも存在することから細胞確保が容易である。そこで EPC を利用した悪性グリオーマに対する自家細胞療法の開発を試みた。今回、悪性グリオーマ細胞をアポトーシスへ誘導したり、また抗腫瘍剤への感受性を高めると報告されている Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) と EPC を組み合わせることとした。本研究においては、1) EPC

が soluble (s) TRAIL を高分泌するように遺伝子改変する、2) 煩雑な遺伝子改変ではなく、より簡便に EPC へ抗腫瘍性因子を修飾するべく、自然界において最強の結合能を有する avidin-biotin system を利用した EPC 細胞表面への sTRAIL の付加を試みる、3) 細胞増殖を促進するタンパク (survivin あるいは SV40 Large T- antigen) を遺伝子ではなくタンパクの形で EPC へ細胞導入する手法により EPC を ex vivo で効率良く増やす技術を確立する、という 3 項目を目標とした。

### 3. 研究の方法

EPC の遺伝子的改変によるアプローチについては、まずは TRAIL 遺伝子導入用のベクターを構築する。ベクター構築後に、最初は比較的容易に遺伝子導入が可能と思われるマウス線維芽細胞 NIH/3T3 を用いて TRAIL 遺伝子導入が効率的に可能か検討し、その後、ヒト EPC を用いて遺伝子改変を図り遺伝子導入効果を検討する。また遺伝子導入が図れた場合には悪性グリオーマ細胞の共培養系において悪性グリオーマ細胞のアポトーシスが惹起できるのかを検討する。さらにヌードマウスの脳へのヒト悪性グリオーマ移植モデルにおいて遺伝子改変ヒト EPC を尾静脈から投与し悪性グリオーマ細胞の進展が抑えられるのかを検討する。

一方、Avidin-biotin system を利用した細胞膜修飾については、まず Sulfo-NHS-biotin を用いて NIH/3T3 の細胞表面へ biotin 付加を試み、次いで avidin を介して biotin 化した soluble TRAIL を付着させることを試みる。こうして細胞修飾した NIH/3T3 細胞の Matrigel invasion assay を行い、Matrigel を越えてきた後にも細胞修飾が維持されているのかを検討する。さらに細胞修飾 NIH/3T3 細胞と悪性グリオーマ細胞の共培養系において悪性グリオーマ細胞のアポトーシスが惹起できるのかを検討する。タンパク導入による幹細胞の増殖能の増強についてのアプローチにつ

いては、細胞通過シグナルである TAT 配列、エンドソーム離脱シグナルである HA2 配列、核移行シグナル NLS、エピトープ・タグである tag 配列、そしてヒトの survivin タンパクの融合遺伝子配列を作成した上でヒトへ最適化し、この融合タンパク遺伝子を大腸菌にてタンパク合成を試みる。さらに新規抗腫瘍性物質のヒト悪性グリオーマ細胞に対する効果についても検討する。

#### 4. 研究成果

##### 1) マウス EPC を利用した基礎的検討

###### (a) マウス骨髄系細胞からの EPC への分化・誘導

安楽死させたマウスの大腿骨と脛骨を採取した後、骨髄細胞浮遊液を回収し、単細胞浮遊液とし、Lonza 社製の専用培養液にて 15 日間培養後に、細胞表面マーカー (CD34, CD309) により培養・分化させた細胞が EPC であることを確認した。

###### (b) マウス EPC への TRAIL 遺伝子導入

マウス骨髄系細胞より分化・誘導された EPC への遺伝子導入のアプローチとして、既に構築済みのプラスミド (pSec-hsTRAIL) を用いて NIH/3T3 への遺伝子導入を脂質系トランスフェクション試薬を用いて試みたが、細胞から human TRAIL の分泌は微弱であった。そこでエレクトロポレーション (Neon Transfection System) を用いて遺伝子導入を試みたところ遺伝子導入効果の改善が見られた。

###### (c) Avidin-biotin system を利用した細胞膜修飾についての基礎的検討

まずは Sulfo-NHS-biotin (Thermo) を用いた細胞表面への biotin 付加の手法を試みた。既に購入済みであった。Sulfo-NHS-biotin を培養した NIH/3T3 細胞の培地へ加え、細胞表面に biotin を付加した。次いで、Qdot ストレプトアビジンを反応させると、細胞表面に Qdot の蛍光シグナルを確認した。つまり細胞表面

に biotin が付加されたことが確認された。さらにこの細胞を用いて Matrigel invasion assay を行ったところ、Matrigel を通過した後も細胞表面に Qdot の蛍光シグナルを確認し、biotin が細胞表面から離脱していないことが確認できた。

##### 2) ヒト血管内皮前駆細胞を使った実験

###### (a) 遺伝子的細胞改変

まず OriGene 社製のベクター pCMV-AC-GFP のマルチクローニングサイトに human soluble TRAIL と full length human TRAIL をインサートし、遺伝子導入用のベクターを構築した。ヒト血管内皮前駆細胞 (human endothelial colony forming cell: HECFC) については Lonza 社製のヒト臍帯血から調整された単核細胞から単離された培養細胞を用意した。先に構築したベクターを用いてエレクトロポレーションにて HECFC への遺伝子導入を試みた。その結果、1 割程度の細胞に GFP 蛍光の発現を認め、遺伝子導入が確認された。遺伝子導入が確認された HECFC を採取し、保存した。次いで TRAIL 遺伝子が導入された HECFC において TRAIL 分泌の有無を ELISA に測定したところ TRAIL 分泌が確認できた。さらに TRAIL 遺伝子導入 HECFC の脳への移行の有無を確認するため、TRAIL 遺伝子導入 HECFC を十分に増やした上でヌードマウスの尾静脈から血管内へ投与したところ脳への移行を確認した。

###### (b) ビオチン-アビジンを使った細胞改変

ヒト血管内皮前駆細胞 (human endothelial colony forming cell: HECFC) を用いて細胞修飾を試みた。Sulfo-NHS-biotin を単層培養した HECFC の培地へ加え、細胞表面にビオチン biotin を付加した。次いでアビジンを加えて細胞表面のビオチンにアビジンを付加した。一方で実験 1) (a) の実験の HECFC の培養上清へ分泌された TRAIL タンパクを精製した上でビオチン化し、このビオチン化した

TRAIL タンパクを先ほどのアビジン付加した HECFC の培地へ加えた。その後、単層培養した HECFC を分散させた上で抗 TRAIL 抗体にて蛍光免疫染色を行ったところ、細胞表面に蛍光を認め、細胞表面に TRAIL タンパクが付加されたことを確認した。

### 3) タンパク導入による幹細胞の増殖能の増強

細胞通過シグナルである TAT 配列、エンドソーム離脱シグナルである HA2 配列、核移行シグナル NLS、エピトープ・タグである tag 配列、そしてヒトの survivin タンパクの融合遺伝子配列を作成した上でヒトへ最適化した。この融合タンパク遺伝子を大腸菌にてタンパク合成を試みているが現在までのところ、目的タンパクの合成には成功していない。

### 4) 新規抗腫瘍性物質のヒト悪性グリオーマ細胞に対する効果

#### (a) Apigenin

Apigenin は、植物フラボノイドの一つであり、MAPK を阻害すると言われており、大腸がんや、卵巣がんなど様々な分野でその効果が証明されている。そこで Apigenin の抗腫瘍効果をヒト・グリオブラストーマ細胞株 T98G と U87MG を用いて増殖、浸潤、血管新生の三つの面から検討を加えた。細胞の増殖への Apigenin の影響については、U87MG、T98G の両細胞において、Apigenin の投与濃度が上昇するにつれ、細胞生存率は減少した。細胞の浸潤に関しても同様に、Apigenin の投与濃度が上昇するにつれ、Matrigel を通過した腫瘍細胞の数は減少した。また細胞の血管新生についても Apigenin の濃度が上昇するにつれ、新生血管網は減少し、Apigenin が濃度依存的にグリオブラストーマ細胞の血管新生誘導を低下させることが判明した。

#### (b) NF- $\kappa$ B Activation Inhibitor IV

近年、ぶどうの皮などに含まれるレスベラトロールという物質は老化防止という面で注目されているが、そうした作用以外に

NF- $\kappa$ B 阻害作用も報告されている。これまでにレスベラトロールによる NF- $\kappa$ B 阻害を介した抗腫瘍効果は報告されているものの、レスベラトロールの活性を高めた NF- $\kappa$ B Activation Inhibitor IV (Clibiochem 社；以後、NAI IV と略す)による抗腫瘍効果は明らかとされていない。そこで T98G と U87MG の 2 種類のヒト・グリオブラストーマ細胞株に対する NAI IV の抗腫瘍効果を増殖、浸潤、血管新生の面から検討した。MTT assay を用いた増殖抑制の検討では T98G ならび U87MG ともに NAI IV の濃度が高まるにつれて増殖抑制効果が高まり、NAI IV がグリオブラストーマ細胞の増殖抑制効果を持つことが示された。また Matrigel invasion assay による細胞浸潤抑制の検討では NAI IV の濃度が高くなるにつれ浸潤する U87MG 細胞の減少を認め、NAI IV が濃度依存的にグリオブラストーマ細胞の浸潤を抑制することが示された。さらに Angiogenesis assay 法による血管新生の検討では NAI IV の濃度が高くなるにつれて新生血管の減少を認め、NAI IV が濃度依存的にグリオブラストーマ細胞が誘導する血管新生を抑制することが示された。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Nakabayashi H, et al.: A novel fluorinated stilbene exerts antitumor activity in glioblastoma cells. 2013 European congress of pathology

Nakabayashi H, et al.: Antitumour effect of Apigenin against glioblastoma cell lines. 2013 European Cancer Congress

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中林博道 (NAKABAYASHI HIROMICHI)

大分県立看護科学大学・看護学部・教授

研究者番号： 70346716

### (2) 研究分担者

天野 託

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号： 10294547

### (3) 連携研究者

中谷善彦

国際医療福祉大学・薬学部・助教

研究者番号： 40582169