

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390339

研究課題名(和文) 腫瘍微小環境に基づいたVEGF抑制を超える脳腫瘍に対する血管新生抑制療法の開発

研究課題名(英文) Anti-angiogenic therapy for glioma beyond VEGF inhibition based on tumor microenvironment

研究代表者

高野 晋吾 (TAKANO, Shingo)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：50292553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫の血管新生にはVEGF誘導による血管内皮細胞の働き以外に、微小環境の細胞とのクロストークが重要であることが明らかにされた。微小環境には腫瘍細胞のほか、腫瘍幹細胞、間葉系幹細胞、周皮細胞により血管新生が促進された。そのVEGF以外の標的分子としてSDF-1 (CXCR4)の関与は少なく、RANTESが注目された。今後、さらに標的分子の効果を動物モデルで確認するとともに、クロストークの点で神経と血管とのクロストークとして、神経血管ワイアリング分子の検討を今後行っていく。

研究成果の概要(英文)：Crosstalk between tumor cells and cells composed of tumor microenvironment as well as endothelial cells is important for glioma angiogenesis. Glioma angiogenesis evaluated by endothelial cell tube formation induced by glioma conditioned medium. Glioma tube formation was stimulated by tumor stem cell, mesenchymal stem cell and pericyte. The target molecules for stimulation of tube formation were determined RANTES, but not SDF-1. Further studies, such as RANTES targeted animal study and new crosstalk molecule, neurovascular wiring molecule are needed for clinical use of these molecules as antiangiogenic agent.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経膠腫 血管新生 微小環境 周皮細胞 RANTES VEGF 神経血管ワイアリング SDF1

#### 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫の強力な血管新生因子である VEGF の中和抗体；ペバシズマブが臨床に導入されたが、その効果には大規模第 III 相臨床でも生存期間の延長にはその効果は不十分であり、その抵抗性が問題となっている。

#### 2. 研究の目的

抵抗性を克服するために、血管新生に関与する神経膠腫を構成する微小環境に注目し、構成する細胞群のクロストークを明らかにし、クロストークを抑制することにより、VEGF 抑制を超える脳腫瘍に対する血管新生抑制療法の開発を目指すことを目的として研究を行った。

#### 3. 研究の方法

##### 1. 腫瘍細胞と間葉系幹細胞のクロストーク

微小環境の中で初年度は腫瘍細胞の代謝に関して IDH の関与 (Kaneko M, Takano S, 2013) を明らかにした。IDH1 の発現はグリオーマの各悪性グレードで予後良好因子であったが、血管新生の程度と VEGF 発現は有意な予後因子ではなかった。また、腫瘍細胞と間葉系幹細胞とのクロストーク (Akimoto K, Takano S, 2012) を明らかにした。脂肪組織由来の間葉系細胞をグリオーマ細胞と共培養すると血管新生因子の高発現がみられ血管造成の盛んな腫瘍が形成された。また腫瘍幹細胞の内皮細胞への transdifferentiation には SDF1/CXCR4 ケモカインの関与は少ないことを明らかにした (Uemae U, Takano S, 2014)。細胞培養として、ヒトグリオーマ細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、マウス人工腫瘍幹細胞に加えて、ヒト周皮細胞とヒト微小血管内皮細胞の培養を開始し、各細胞間のクロストークの標的分子を見出し、その抑制による脳腫瘍血管新生抑制実験を試みた。

##### 2. 内皮細胞と周皮細胞の共培養

ヒト内皮細胞と周皮細胞のクロストークを評価するために両細胞の共培養モデルを確立した。すなわち、血管内皮細胞の管腔形成能は周皮細胞との共培養で増強され、6 種類の神経膠腫の細胞種類の培養上清により違いがみられた。腫瘍細胞の培養上清に含まれる血管新生因子、ケモカインを抗体アレイで絞り込み、最も微小環境モデルに影響を及ぼす VEGF 以外の因子を同定した。

##### 3. グリオーマ誘発性血管新生に係る因子の同定

ヒトグリオーマ細胞培養上清により誘発される血管内皮細胞の管形成能は周皮細胞との共培養で増強され、6 種類のグリオーマの細胞種類の培養上清の違いにより違いがみられ、管腔形成能を定量評価した。腫瘍細胞の培養上清に含まれる血管新生因子、ケモカインを抗体アレイで半定量した。管腔形成能の程度と、培養上清の血管新生因子の程度を比べて相関がみられる因子として、IL8, TIMP-1, RANTES, IL6, MMP1, Tie2, VEGFR2 が検出された。これらの中で、これまで報告の少ない RANTES に焦点を絞り、次の検討を進

めた。グリオーマでの RANTES の mRNA 発現を確かめ、パラフィン切片でその局在を確かめた。RANTES はグリオーマで発現が強く見られた。グリオーマ細胞の RANTES 発現を siRNA にてノックダウンして、培養上清による管腔形成能が抑制されるかどうか検討した。RANTES はグリオーマ誘発の血管新生 (管腔形成能) にかかわる VEGF 以外の重要な因子であることが明らかにされた。

##### 4. グリオーマにおける血管密度評価の見直し

膠芽腫に対する VEGF 中和抗体の大規模第 III 相臨床試験では、生存期間の延長は見られなかったが、血管新生がグリオーマ患者の生存期間に影響を及ぼしているのか自験例で検討した。142 例のグリオーマ組織の切片で CD34 染色を行い、CD34 で染色される腫瘍血管数の定量値 (0.1mm<sup>2</sup> 当たりの血管数: 血管密度) が患者の生存期間に影響を及ぼしているかどうか検討した。血管密度はグレード 4 (n51), グレード 3 (n53), グレード (n38) は、それぞれ 47.3±29.3, 38.1±25.7, 23.0±15.3 であり、グレード 4 はグレード 2 に比べて有意に (p<0.001)、グレード 3 はグレード 2 に比べて有意に (p<0.01) density が高かった。

血管密度がグリオーマの予後に関係するかどうかを Kaplan Meier curve を用いて 142 例で確かめてみると、生存期間中央値は血管密度が高い群 (>30, n71) では 55.2 か月、低い群 (<30, n71) では 32.0 か月であり、血管密度が高い群で有意に予後が長かった (Log-rank test p<0.01, HR 0.7040, 95% CI 0.2266 - 0.7723)。以上より、グリオーマの血管密度であらわされる血管新生能はグリオーマの種類によって異なり、重要な予後因子であることが改めて明らかにされた。

##### 4. 研究成果

神経膠腫の血管新生には VEGF 誘導による血管内皮細胞の働き以外に、微小環境の細胞とのクロストークが重要であることが明らかにされた。微小環境には腫瘍細胞のほかに、腫瘍幹細胞、間葉系幹細胞、周皮細胞により血管新生が促進された。その VEGF 以外の標的分子として SDF-1 (CXCR4) の関与は少なく、RANTES が注目された。今後、さらに標的分子の効果を動物モデルで確認するとともに、クロストークの点で神経と血管とのクロストークとして、神経血管ワイアリング分子の検討を今後行っていく。

##### 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 15 件)

1. 高野晋吾, 松田真秀, 石川栄一, 坂本規影, 阿久津博義, 木野弘善, 山本哲哉, 松村明: グリオーマの免疫染色定量評価. Neuro-Oncology の進歩 23-1: 14-22, 2016. 査読あり
2. Shingo Takano, Eiichi Ishikawa, Noriaki

- Sakamoto, Masahide Matsuda, Hiroyoshi Akutsu, Masayuki Noguchi, Yukinari Kato, Tetsuya Yamamoto, Akira Matsumura: Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol* 33: 107-116, 2016. 査読あり
3. Shingo Takano, Tetsuya Yamamoto, Eiichi Ishikawa, Hiroyoshi, Akutsu, Kei Nakai, Masahide Matsuda, Ai Muroi, Yasushi Shibata, Masashi Mizumoto, Koji Tsuboi, Akira Matsumura. P-03 Improvement of Long Term Results With Adjuvant Chemoradiation Therapy for Central Nervous System Germinoma (p569). Abstracts From the 4th International CNS Germ Cell Tumor Symposium (Happo-en, Tokyo, Japan April 12-15, 2015). *Pediatric Neurology* 53: 551-578, 2015. 査読なし
  4. Fujii Y, Ogasawara S, Oki H, Liu X, Kaneko MK, Takano S, Kato Y: A high-sensitive HMAb-2 specifically detects IDH1-R132H, the most common IDH mutation in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Oct 30;466(4):733-9. 査読あり
  5. Takano S, Akutsu H, Mizumoto M, Yamamoto T, Tsuboi K, Matsumura A: Neuroendoscopy followed by radiotherapy in cystic craniopharyngiomas-a long-term follow-up. *World Neurosurg*. 84: 1305-1315, 2015. doi: 10.1016/j.wneu.2015.06.022. 査読あり
  6. Takano S, Yamamoto T, Ishikawa E, Akutsu H, Nakai K, Matsuda M, Muroi A, Shibata Y, Mizumoto M, Tsuboi K, Matsumura A: Improvement of long-term results with neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy for central nervous system germinoma. *World Neurosurg*. 84: 846-854, 2015. doi: 10.1016/j.wneu.2015.06.029. 査読あり
  7. Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Liu X, Ishikawa E, Kaneko MK, Ogasawara S, Matsuda M, Noguchi M, Matsumura A: Diagnostic advantage of double immunohistochemistry using two mutation-specific anti-IDH antibodies (HMAb-1 and MsMAb-1) in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 32: 169-175, 2015. DOI 10.1007/s10014-015-0214-8 査読あり
  8. Takano S et al. Correlations of vascular architecture and angiogenesis with pituitary adenoma histotype. *Int J Endocrinol* vol. 2014, Article ID 989574, 12 pages, 2014. doi:10.1155/2014/989574. 査読あり
  9. Takano S et al. Bevacizumab in Japanese Patients with Malignant Glioma from Basic Research to Clinical Trial. *OncoTargets Ther* 7: 1551-1562, 2014. 査読あり
  10. Takano S et al. Interferon-inhibits glioma angiogenesis through downregulation of vascular endothelial growth factor and upregulation of interferon inducible protein 10. *Int J Oncol*. 45: 1837-1846, 2014. 査読あり
  11. Uemae Y, Ishikawa E, Osuka S, Matsuda M, Sakamoto N, Takano S, Nakai K, Yamamoto T, Matsumura A: CXCL12 secreted from glioma stem cells regulates their proliferation. *J Neurooncol*. 117: 43-51, 2014. PMID:24442483. 査読あり
  12. Takano S, Kin H, Tsuda K, Osuka S, Nakai K, Yamamoto T, Ishikawa E, Akutsu H, Matsuda M, Matsumura A. Decrease in the Apparent Diffusion Coefficient in Peritumoral Edema for the Assessment of Recurrent Glioblastoma Treated by Bevacizumab *Acta Neurochirurgica Supplement*, 118: 185-189, 2013. DOI 10.1007/978-3-7091-1434-6\_34. 査読あり
  13. Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A, Saya H: IGF1 Receptor Signaling Regulates Adaptive Radioprotection in Glioma Stem Cells. *Stem Cells*. 31: 627 - 640, 2013. Jan 17. doi: 10.1002/stem.1328. 査読あり
  14. Kaneko MK, Morita S, Tsujimoto Y, Yanagiya R, Nasu K, Sasaki H, Hozumi Y, Goto K, Natsume A, Watanabe M, Kumabe T, Takano S, Kato Y. Establishment of novel monoclonal antibodies KMab-1 and MMab-1 specific for IDH2 mutations *Biol Biophys Res Commun* 432: 40-45, 2013. 査読あり
  15. Akimoto K, Kimura K, Nagano M, Takano S, To'a Salazar G, Yamashita T, Ohneda O. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. *Stem Cells Dev*. 22(9):1370-86, 2013. doi: 10.1089/scd.2012.0486. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 11件)
- 学会発表
1. 高野晋吾、石川栄一、松田真秀、加藤幸成、山本哲哉、松村 明：悪性神経膠腫におけるポドプラニン発現・IDH 変異・Akt シグナルによる予後解析. 脳腫

- 瘍学会 (2015年12月6日 京都府、京都市、京都プリンスホテル)
2. 高野晋吾、石川栄一、松田真秀、中井 啓、阿久津博義、山本哲哉、加藤幸成、松村明：血管内皮増殖因子 (VEGF) / 低酸素誘導因子 (HIF1) 発現は IDH 変異とは独立したグリオーマの予後因子である。第 74 回日本脳神経外科学会総会 (2015年10月14日、北海道、札幌市、ロイトン札幌)
  3. 高野晋吾、石川栄一、松田真秀、金子美華、加藤幸成：Podoplanin expression combined with IDH mutation as a prognostic factor with high grade gliomas. 第74回日本癌学会総会 (2015年10月8日、愛知県名古屋市、名古屋国際会議場)
  4. 高野晋吾、石川栄一、松田真秀、加藤幸成、山本哲哉、松村 明：悪性神経膠腫におけるポドプランニン発現・IDH 変異・Akt シグナルによる予後解析。第 16 回分子脳神経外科学会 (2015年8月29日、静岡県、浜松市、アクトシティー浜松)
  5. 高野晋吾、山本哲哉、石川栄一、坂本則影、松田真秀、中井 啓、阿久津博義、加藤幸成、松村 明：分子診断による grade III グリオーマの予後解析。第 33 回日本脳腫瘍病理学会 (シンポジウム、2015年5月29日、香川県、高松市、クレイトン高松)
  6. 高野晋吾、阿久津博義、原 拓真、山本哲哉、松村 明：下垂体腺種の組織型による血管新生と血管構築の関係。第 25 回間脳下垂体腫瘍学会 (2015年2月27日、京都府、京都市、京都テルサ)
  7. 高野晋吾、石川栄一、松田真秀、山本哲哉、松村 明：グリオーマにおける可溶性 VEGF レセプター (sFlt-1) の役割。第 32 回日本脳腫瘍学会 (2014年11月30日、千葉県、浦安市、シェラトングランドトウキョウベイホテル)
  8. 高野晋吾、中井 啓、石川栄一、松田真秀、室井 愛、増本智彦、山本哲哉、松村 明：ペバシズマブにより予後改善する膠芽腫。第 73 回脳神経外科学会総会 (2014年10月10日、東京都、港区、グランドプリンスホテル新高輪)
  9. 杉井成志、高野晋吾、山本哲哉、石川栄一、阿久津博義、松田真秀、坂本規影、増本智彦、松村 明：Central neurocytoma の血管新生能。第 32 回脳腫瘍病理学会 (2014年5月23日、香川県、徳島市、クレイトン高松)
  10. Shingo Takano, Tetsuya Yamamoto, Eiichi Ishikawa, Hiroyoshi Akutsu, Kei Nakai, Masahide Matsuda, Ai Muroi, Yasushi Shibata, Masashi Mizumoto, Koji Tsuboi, Akira Matsumura: Improvement of long term results with adjuvant chemoradiation therapy for

central nervous system germinoma. The 4th International CNS Germ Cell Tumour Symposium (Apr 12, 2014, Tokyo, Minato, Happon)

〔図書〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高野晋吾 (TAKAN0, Shingo)  
筑波大学附属病院・病院講師  
研究者番号：50292553

### (2) 研究分担者

久保田義顕 (KUBOTA, Y0shinori)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：50348687

### (3) 研究分担者

山下年腫 (YAMASHITA, Toshiharu)  
筑波大学医学医療系・助教  
研究者番号：50400677

### (4) 研究分担者

依馬正次 (EMA, Masatsugu)  
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授  
研究者番号：60359678