

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592178

研究課題名(和文)血管新生抑制因子と低酸素反応阻害因子併用による新しい悪性グリオーマ化学療法の確立

研究課題名(英文)A novel chemotherapy of malignant glioma by concomitant use of inhibitors for angiogenetic factor and hypoxia-inducible factor

研究代表者

林 拓郎 (HAYASHI, Takuro)

藤田保健衛生大学・医学部・客員講師

研究者番号：40296611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトグリオーマ細胞U251を用いて、血管新生阻害剤と低酸素反応阻害剤を併用することで悪性グリオーマの発育を阻止できるか培養系および動物移植実験を用いて検討した。分子抗体薬ベバシズマブによって惹起される低酸素状態によりあらたに引き起こされる血管新生をHIF1阻害剤であるラパマイシンにより阻害することで腫瘍増大を阻止できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using human glioma cell line U251, biological responses of glioma cells to combination usage of angiogenesis inhibitor (bevacizumab) and chemotherapeutic agent (rapamycin) was investigated in vitro and in vivo. The result of this study suggested that the growth of glioma might be inhibited by rapamycin, which blocked the secondary angiogenesis, resulted from hypoxic state by bevacizumab. Thus, this type of concomitant therapy could be one of the novel approaches of malignant glioma.

研究分野：neurooncology

キーワード：malignant glioma bevacizumab rapamycin angiogenesis hypoxia xenograft

## 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマの治療において可及的な外科的切除後の放射線療法、化学療法の補助療法は不可欠である。近年、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) に対するモノクローナル抗体であるベバシズマブによりグリオーマ細胞は画像検査上、優位な腫瘍縮小効果を認めることが報告されている、しかしながら、その後の検討では生存期間の有意な延長は認められないとされている。つまり、ベバシズマブの血管新生抑制効果により血管新生抑制効果により血管を多く含む腫瘍塊 (tumor bulk) としての増殖は抑制できるため、MRI などの造影検査で増強される腫瘍塊は縮小すると考えられるが、一方で悪性グリオーマ特有な腫瘍塊周辺の脳実質にしみ込むような浸潤性増殖を抑制することはベバシズマブでは困難と考えられる。さらにベバシズマブ投与後、一時的に低酸素に陥ったグリオーマ細胞では反応性に何らかの別の機序による血管新生が働き、グリオーマ細胞が遊走しやすい状態に変化していることも考えられる。悪性腫瘍に対する酸素供給は腫瘍の生存のために重要な因子であり、低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor 1 ; HIF1 ) や Heat Shock Protein 90 (HSP90) の発現は VEGF などの増殖因子の転写において重要な役割を担っているが、ベバシズマブ投与後の悪性グリオーマ細胞においてはそのメカニズムは不明である。本研究において、ベバシズマブ投与後の悪性グリオーマの再増大に VEGF の過剰発現が関与しているのか、さらに HIF1 や HSP90 の発現が関与しているのか、HIF1 阻害剤によりヒトグリオーマ細胞の増殖を抑えることが可能か、ベバシズマブ、HIF1 阻

害剤併用により腫瘍塊の縮小のみならず、浸潤性発育も抑制することが可能か、について in vitro 及び in vivo において検討する。HIF1 は種々の増殖因子の転写を誘導しており、虚血性心疾患や低酸素脳症などの虚血性病変だけでなく悪性腫瘍の増殖や進展にも関与している。マクロライド系抗生物質ラパマイシンは VEGF を介した血管新生の阻害にかかわり、HIF1 がその仲介役であることが知られている。HSP90 は低酸素時の血管新生だけでなく、悪性腫瘍内に強く発現することも知られている。このような因子の阻害剤をベバシズマブとともに投与することにより、ベバシズマブにより VEGF が阻害され腫瘍塊が縮小し、その後の低酸素状態での腫瘍細胞の遊走をさらに阻害し、浸潤性発育を抑制することが期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では上記背景およびこれまでの研究成果を基に、未だ解明されていないヒトグリオーマ細胞における VEGF を介した血管新生の機序、並びにさまざまな血管新生経路を阻害することによるグリオーマの増殖阻害の基礎的な研究を行い、現在のテモゾロミドのみに頼らざるを得ないグリオーマ補助療法の現況を打破する新しい治療法を開発する基盤となる研究を行う。研究期間内には主に以下のことについて検討した。i) ベバシズマブ投与後の再増大時のヒトグリオーマ細胞における VEGF や HIF1、などの低酸素、血管新生に関わる因子の発現について明らかにする。

ii) ヒトグリオーマ細胞に対する HIF1 阻害剤の増殖抑制効果を検討する。

iii) マウスxenograftモデルを用いて、ベバシズマブ、HIF1 阻害剤併用によるグリオーマ腫瘍塊の縮小および浸潤性発育の抑制の可能性に関する検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1)グリオーマの血管新生阻害分子抗体薬による低酸素状態からなる再血管新生の阻害に関する培養系における検討

VEGFを阻害する分子抗体薬ベバシズマブと hypoxia-inducible factor阻害薬であるラパマイシンによりヒトグリオーマ細胞U251の増殖が抑制できるか検討した。

培養ヒトグリオーマ細胞U251を用いた予備実験として、ラパマイシン単剤によるグリオーマ細胞に対する毒性の有無を薬剤処理後の集落形成能にて検討した。同剤は PI3K-Akt-mTOR経路を阻害するもので、主に G1チェックポイント関連蛋白を阻害し、少なからず細胞毒性を有するとされている。

ベバシズマブ単剤によるグリオーマ細胞に対する細胞毒性も同様に検討した。(ベバシズマブ自体には抗腫瘍作用はほぼないとされるが施行した)。

ベバシズマブとラパマイシンを併用処理細胞において、同様の検討を行った。

①-③に関し、細胞周期解析をDNA染料 propidium iodineを用いた fluorescent activated cell sorter (FACS)で解析した。

また、同様の薬剤条件でグリオーマ細胞 5000/  $\mu$ lを接着培地で培養し、比較した。

(2) マウス皮下移植モデルを用いたベバシズマブ・ラパマイシン併用療法の効果 -腫瘍体積の比較検討-

ヒトグリオーマ細胞U251  $1 \times 10^6 / 10 \mu$ lを BALB/c mouse (female)の右側腹部皮下に移植し、対照群、ベバシズマブ投与群、ラパマイシン投与群、併用群で経時的に腫瘍体積を求めた。投与前の体積との増加率を各群で比較した。

(3) マウス脳内移植モデルを用いたベバシズマブ・ラパマイシン併用療法の効果 -生存率および組織学的検討-

ヒトグリオーマ細胞U251  $1 \times 10^6 / 10 \mu$ lを BALB/c mouse (female)の右線条体に定位置植し、生存分析を行った。

28日目に生存しているマウスのみを断頭し、脳切片を作成してHE染色および抗VEGF抗体、抗HIF1 抗体、抗HSP90抗体を用いて比較検討した。

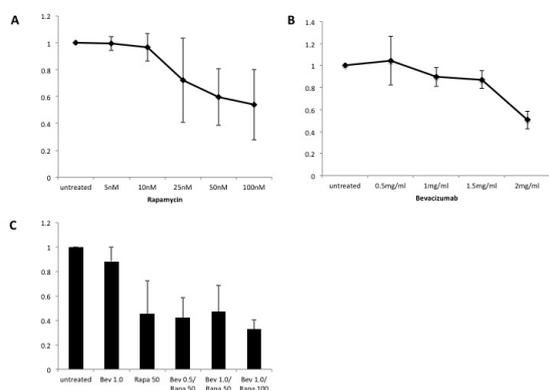
### 4. 研究成果

1)グリオーマの血管新生阻害分子抗体薬による低酸素状態からなる再血管新生の阻害に関する培養系における検討

培養ヒトグリオーマ細胞 U251 においてラパマイシンの優位な細胞毒性は示唆されなかったが 100 nM 以上で細胞毒性が強くなると判断し(図 1A)、この濃度未満での使用によりベバシズマブの効果増強を検討することとした。ベバシズマブの細胞毒性はきわめて低いもので

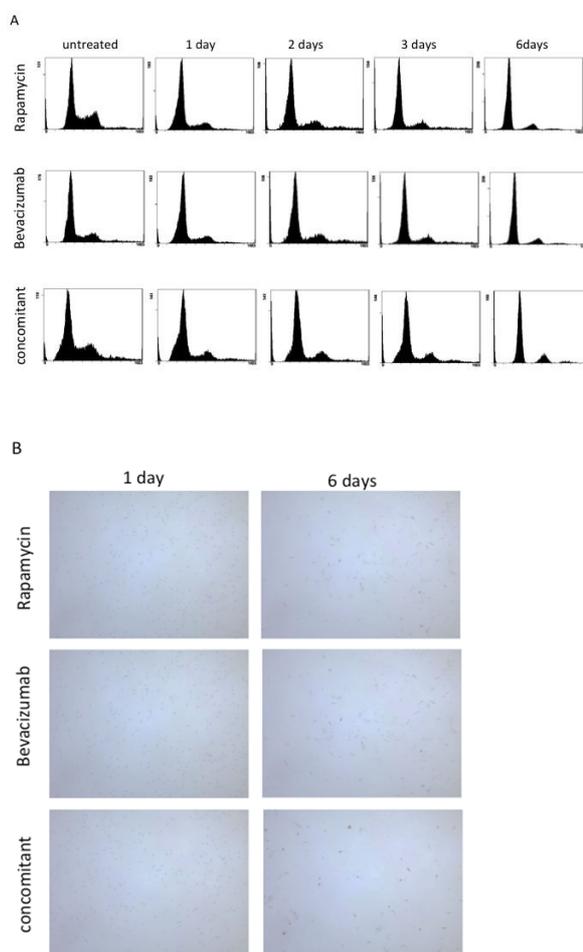
あるが、ベバシズマブでも同様の検討を行った (図 1B)。ベバシズマブ単独で生存細胞数がきわめて低くならないほうがラパマイシンの上乗せ効果が検討しやすいと考えた。また、併剤での検討ではベバシズマブ単独よりも併剤使用でグリオーマ細胞に対する抗腫瘍効果が示唆された (図 1C)。以上より、以下の実験ではラパマイシン 50 nM、ベバシズマブ 1.0 mg/ml で使用した。

図 1



FACSを用いた細胞周期解析では、ラパマイシン群ではG1期での細胞が蓄積していた。ベバシズマブ群では細胞周期とは一定の関連性が示唆されず、併用群ではラパマイシン群と同様にG1期での細胞の蓄積を認めた (図2A)。ラパマイシンはmTORの阻害による抗腫瘍効果を持つためmTORの促進するG1/S移行を阻害した結果と考えられた。

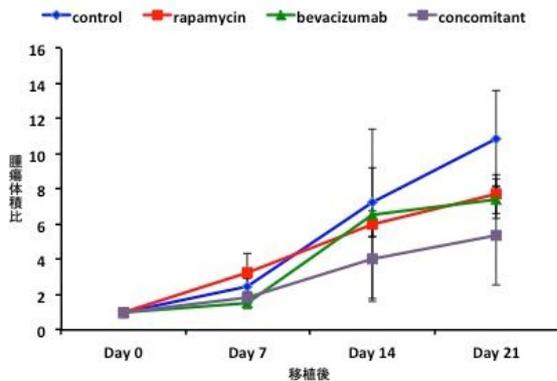
接着培養では併用群で著明な細胞数の低下を認めており、一方、ラパマイシンおよびベバシズマブの単独群では併用群に比して抗腫瘍効果は得られなかった。図1および図2Aの結果を支持するものと考えられた。



## (2) マウス皮下移植モデルを用いた腫瘍体積の比較検討

in vivoにおけるヒトグリオーマ細胞U251に対するラパマイシン、ベバシズマブおよび併用療法による抗腫瘍効果を評価するためBALB/C マウスの皮下移植を行った。頭蓋内とは周囲の環境が異なるが、皮下に移植することで腫瘍体積の評価を行った。グリオーマ細胞 $1.0 \times 10^6 / 10 \mu l$ を移植した後に1週間程度で腫瘍塊 (径5-10mm程度) の形成が確認されたマウスにのみ投与を行った。投与開始21日後では、対照群に比較して、ラパマイシン、ベバシズマブは腫瘍塊の増大の抑制を認め、併用群ではさらに抑制されていた (図3)。

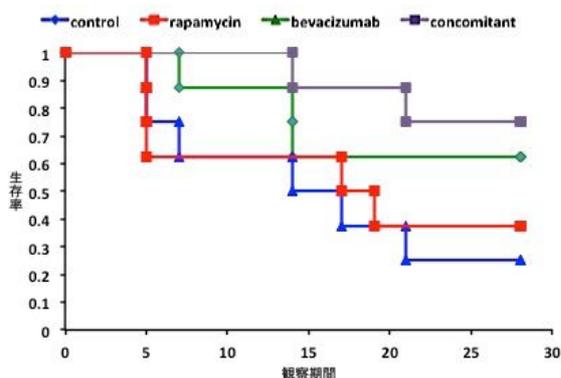
図3



(3) マウス脳内移植モデルを用いた生存率および組織学的検討

(2)と同様の条件でヒトグリオーマ細胞をBALB/c マウスを用いて脳内移植を行った。移植後、脳内移植7日後にラパマイシン、ベバシズマブを7日ごとに腹腔内投与した。投与開始28日後時点での生存例では脱脳し、パラフィン切片を作成し脳内に明らかな腫瘍塊が認められないものは除外した。ラパマイシン、ベバシズマブ投与群では対照群に比して生存期間が延長したが、併用群ではさらに延長を認めた(図4)。

図4

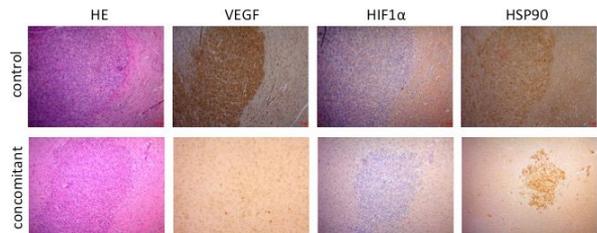


組織学的検討

で作成した移植28日後のマウス脳パラフィン包埋切片を組織学的に検討した。

併用群では VEGF、HSP90 の発現が抑制されていた。他の群では明らかな傾向は見いだせなかった(図5)。

図5



以上のように、ヒトグリオーマ細胞 U251 に対して、mTOR 阻害剤ラパマイシンの抗腫瘍効果とベバシズマブへの上乗せ効果の

可能性が示唆された。実際にはグリオーマの発生、増大にはグリオーマ幹細胞が関わっていると考えられるため、幹細胞が脳内で分化する様式と外部からのグリオーマ細胞を移植して増大する様式では分化様式が異なると考えられる。このため、今回の結果からは臨床的なグリオーマでの効果は不明であると考えられる。今回の検討でもグリオーマ組織由来の腫瘍幹細胞培養系の確立するため、当施設での腫瘍摘出術の際に採取されたグリオーマ組織を用いて検討を行った。現時点で実験系に用いるために十分な幹細胞の確立はできなかった。しかしながら、U251 から幹細胞が単離された報告(Qiang L et al. Cancer Lett. 2009)もあり、今後のグリオーマ幹細胞を用いた同様の実験において、今回の検討は有意義な結果であったと考える。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】

Radiological features of supratentorial gliomas are associated with their genetic aberrations. Nishiyama Y, Hayashi T,

Hirose Y et al. Neurosurg Rev. 2014 Apr;37(2):291-9; discussion 299-300. doi: 10.1007/s10143-013-0515-5. 査読有  
The Cdk inhibitor flavopiridol enhances temozolomide-induced cytotoxicity in human glioma cells. Hayashi T, Adachi K, Ohba S, Hirose Y. J Neurooncol. 2013 Nov;115(2):169-78. doi: 10.1007/s11060-013-1220-5. 査読有  
Subgrouping of gliomas on the basis of genetic profiles. Hirose Y, Hayashi T, Hasegawa M, Yoshida K et al. Brain Tumor Pathol. 2013 Oct;30(4):203-8. doi: 10.1007/s10014-013-0148-y. 査読有  
Clinical, histological, and genetic features of fourth ventricle ependymoma in the elderly. Case report. Hayashi T, Hirose Y et al. Neurol Med Chir (Tokyo). 2012;52(8):611-6. 査読有

#### 【学会発表】

The Immunohistological and Radiological Survey on Temozolomide-induced Cytotoxicity Enhanced by Cdk Inhibitor in vivo. Hayashi T, Hirose Y et al. Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology, San Francisco, USA, 2013  
Cdk inhibitor flavopiridol enhances temozolomide-induced cytotoxicity in human glioma cells. Hayashi T, Hirose Y et al. The 2012 Congress of Neurological Surgeons Annual Meeting; Chicago, USA. 2012  
グリオーマ細胞移植マウスにおける Cdk 阻害剤併用によるテモゾロミド増強効果に関

する免疫組織学のおよび放射線学的検討.  
林拓郎、廣瀬雄一ほか. 日本脳神経外科学会 第 71 回学術総会. 大阪. 2012

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 拓郎 (HAYASHI, Takuro)

藤田保健衛生大学・医学部・客員講師

研究者番号: 40296611

##### (2) 研究分担者

廣瀬 雄一 (HIROSE, Yuichi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 60218849

伊藤 圭介 (ITO, Keisuke)

研究者番号: 70622934