慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	グリオーマ幹細胞・血管内皮細胞の浸潤複合体を標的とする新しい抗浸潤療法の開発
Sub Title	Development of a novel anti-invasion therapy targeting the glioma stem cell/endothelial cell invasion complex
Author	佐谷, 秀行(Saya, Hideyuki) Sampetrean, Oltea
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	我々はこれまでに, グリオブラストーマ(GBM)においてグリオーマ幹細胞が正常脳の血管を引き込み, 血管内皮細胞と浸潤複合体を形成することを見出した。本研究ではその現象の分子基盤を解明し, 浸潤複合体を標的とする新しい抗浸潤療法の開発を目標とした。マウスGBMモデルを用いた解析より, 浸潤複合体形成を規定する血管内皮細胞側の因子を同定することができた。さらに, 培養脳切片を用いた浸潤抑制剤の評価により, グリオーマ幹細胞のエネルギー産出を抑制する薬剤が抗浸潤効果を示すことを見出した。代謝阻害剤の中から抗浸潤効果が高い薬剤の同定に成功し, 現在, 動物における抗浸潤療法のプロトコール構築を開始している。 We have previously found that in glioblastoma, glioma stem cells can attract blood vessels from the normal brain and form an invasion complex with the endothelial cells of the co-opted vessels. The purpose of the present research was to elucidate the molecular mechanisms underlying the formation of the invasion complex and to develop a new anti-invasion therapy. Using a mouse GBM model, we identified the factors that determine the endothelial cells to participate in the formation of the invasion complex. Furthermore, by evaluating the anti-invasion potential of various classes of drugs using the brain slice culture assay, we found that inhibiting energy production can drastically reduce the invasion of glioma stem cells. We are now testing the most effective metabolic inhibitors in combination with chemotherapeutic agents in several animal models of glioma.
Notes	研究種目 : 基盤研究(A)(一般) 研究期間 : 2013 ~ 2015 課題番号 : 25253085 研究分野 : がん
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25253085seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ６ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５２５３０８５

研究課題名（和文）グリオーマ幹細胞・血管内皮細胞の浸潤複合体を標的とする新しい抗浸潤療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel anti-invasion therapy targeting the glioma stem cell/endothelial cell invasion complex

研究代表者

佐谷　秀行（Saya, Hideyuki）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：８０２６４２８２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　34,700,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに、グリオブラストーマ（GBM）においてグリオーマ幹細胞が正常脳の血管を引き込み、血管内皮細胞と浸潤複合体を形成することを見出した。本研究ではその現象の分子基盤を解明し、浸潤複合体を標的とする新しい抗浸潤療法の開発を目標とした。マウスGBMモデルを用いた解析より、浸潤複合体形成を規定する血管内皮細胞側の因子を同定することができた。さらに、培養脳切片を用いた浸潤抑制剤の評価により、グリオーマ幹細胞のエネルギー産出を抑制する薬剤が抗浸潤効果を示すことを見出した。代謝阻害剤の中から抗浸潤効果が高い薬剤の同定に成功し、現在、動物における抗浸潤療法のプロトコール構築を開始している。

研究成果の概要（英文）：We have previously found that in glioblastoma, glioma stem cells can attract blood vessels from the normal brain and form an invasion complex with the endothelial cells of the co-opted vessels. The purpose of the present research was to elucidate the molecular mechanisms underlying the formation of the invasion complex and to develop a new anti-invasion therapy. Using a mouse GBM model, we identified the factors that determine the endothelial cells to participate in the formation of the invasion complex. Furthermore, by evaluating the anti-invasion potential of various classes of drugs using the brain slice culture assay, we found that inhibiting energy production can drastically reduce the invasion of glioma stem cells. We are now testing the most effective metabolic inhibitors in combination with chemotherapeutic agents in several animal models of glioma.

研究分野：がん

キーワード：細胞・組織　癌　発生・分化

１．研究開始当初の背景

グリオブラストーマ（Glioblastoma, GBM）は治癒不能な脳腫瘍である。その難治性の背景は多肢に渡るが、重要な課題の一つとして、強い浸潤能を規定する因子が解明されておらず、抗浸潤療法が確立していないことが挙げられる。原発巣から正常脳内に遊走した腫瘍細胞は手術や放射線治療の範囲外に存在し、再発の原因となる。我々はこれまでの研究により、浸潤を規定する候補因子の同定に成功し、さらに浸潤能が高い腫瘍細胞が正常血管を引き込む能力を持っており、その現象こそが血管新生療法の重要な標的になるという全く新しい概念を打ち出した。本研究ではそれらの結果に基づいて、*in vivo* で GBM の浸潤性及び血管引き込み現象の共通の分子基盤を解明すると同時に、多角的に有効な低分子化合物を探索し、新たな治療戦略のデザインと実臨床への応用を目指したアプローチを行うことを目標とした。

２．研究の目的

ヒト GBM の浸潤を抑制する薬剤、及び腫瘍細胞による正常脳の血管引き込み現象を抑制する薬剤の開発を最終目標に、本研究ではマウス GBM モデルを用いて

（１）腫瘍細胞による血管引き込み現象の分子基盤解析

（２）腫瘍周囲の微小環境が保たれた評価系での浸潤抑制剤の評価

（３）浸潤抑制剤と抗癌剤の併用投与プロトコールの確立

を目的とした。

３．研究の方法

(1)　**血管引き込み現象の解析**

正常神経幹細胞（*Neural stem cells; NSCs*）に *HRasV12* を導入して作製した腫瘍起源細胞（*Glioma initiating cells; GICs*）及び、*GICs* をマウスの前脳に移植して形成させた腫瘍より単離した腫瘍幹細胞（*Glioma stem cells; GSCs*）を用いて、血管引き込み現象について検証した。各々の細胞の血管引き込み能は血管内皮細胞、腫瘍細胞、細胞外マトリックスで構成される３次元培養システムを用いて、タイムラプスイメージングにより評価した。また、微小環境の血管引き込み現象への影響は培養脳切片のイメージングを用いて評価した。

浸潤複合体形成を制御する因子同定のため、まず血管内皮細胞を *GIC*、*GSC* と共培養し、*3* 種類の細胞より *RNA* を抽出した。*GSC* の影響により血管内皮細胞において上昇した浸潤関連分子を同定するため、リアルタイム *PCR* アレイにて *84* 種類の浸潤関連遺伝子の発現レベルの比較検討を行った。

(2)　**浸潤抑制剤の評価**

培養脳切片で腫瘍細胞の浸潤をリアルタイムで追跡し、作用機序の異なる薬剤を投与し、抗浸潤効果を評価した。細胞の運動を阻害する薬剤として微小管阻害剤、シングル・セルの遊走を阻害する薬剤として上皮間葉転換阻害剤、運動、浸潤に必要なエネルギー産出を阻止する薬剤として解糖系、ミトコンドリア機能の阻害剤に注目し、その効果について検討した。

(3)　浸潤抑制剤と抗癌剤の併用投与プロトコールの確立

（２）で浸潤を抑制する効果が認められた薬剤について、培養脳切片を用いて、脳腫瘍の標準治療に用いられる抗癌剤との併用投与を行い、その効果を評価した。

４．研究成果

(1)　**血管引き込み現象の解析**

腫瘍細胞と血管内皮細胞の *3* 次元培養システムを用いた実験より、正常神経幹細胞及

び GIC のほとんどが血管を引き込むことができないのに対し、一次腫瘍から単離した GSC が血管引き込み能力を有していることが明らかになった（表 1）。

対象現象 （3次元共培養 / 培養脳切片による評価）	神経幹細胞	腫瘍起源細胞	腫瘍幹細胞
血管に沿った浸潤	-/-	+/+	+/+
血管構造の破壊	-/-	+/+	+/+
血管引き込み現象	-/-	-/-	+/+
浸潤複合体の形成	-/-	-/-	+/+

表 1：神経幹細胞、脳腫瘍起源細胞、脳腫瘍幹細胞と血管のインターアクション

さらに、正常脳、腫瘍周囲の微小環境が保たれている培養脳切片を用いて同様の評価を行った結果、GSC の高い血管親和性、血管に沿った浸潤、血管引き込み現象が sem i in vivo の評価系においても確認された（表１）。

次に、血管内皮細胞と腫瘍細胞、特に GSC との共培養実験により、浸潤複合体が形成される際に血管内皮細胞において発現が上昇する浸潤関連因子を特定した。浮かび上がった因子の中から 2 倍以上の発現上昇を示した遺伝子を選ぶことによって、血管内皮細胞側における浸潤複合体形成の規定因子をインテグリンファミリー、マトリックスメタロプロテアーゼファミリーに属する因子を含む 8 因子に絞り込むことに成功した。ネットワーク解析の結果、8 因子のうちの 6 因子が tum or necrosis factor alpha (TNFα)シグナリングとの関連していることが明らかになったため、TNFα が血管引き込み現象の重要なファクターであると考え、現在血管内皮細胞において TNFα 受容体の機能阻害実験を実施している。

(2) **浸潤抑制剤の評価**

パクリタキセルを含む微小管阻害剤では有意な浸潤抑制効果はみられなかった（図１）。

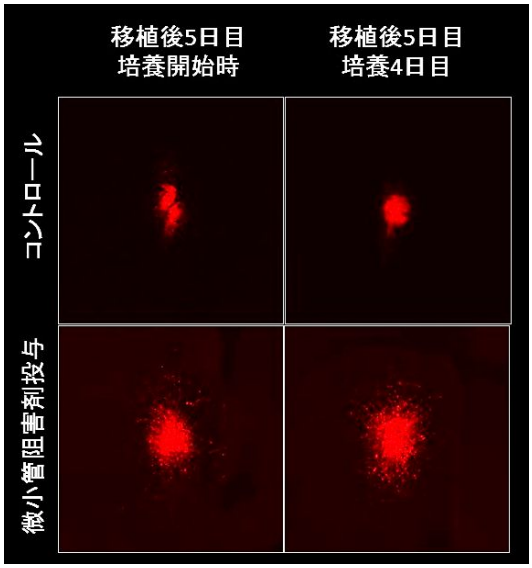

図１ ：培養脳切片を用いた薬剤スクリーニングでは微小管阻害剤による浸潤抑制効果が認められなかった。

一方、上皮間葉転換阻害剤のスクリーニングにより腫瘍細胞の増殖、浸潤とも有意に抑制する薬剤の同定に成功した（図２）。

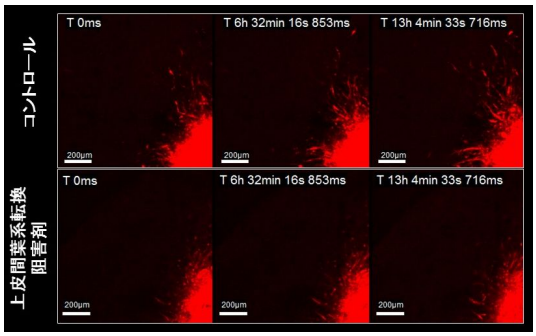

図２： 培養脳切片を用いた薬剤スクリーニングでは上皮間葉転換阻害剤による浸潤抑制効果が認められた。

さらに、GSC のエネルギー産出を阻害する代謝阻害剤の中からも浸潤抑制効果を有する薬剤を複数同定した。培養脳切片を用いたタイムラプスイメージングの結果、同定した薬剤が GSC の血管への親和性、浸潤複合体の形成も抑制することを証明した（図３）。

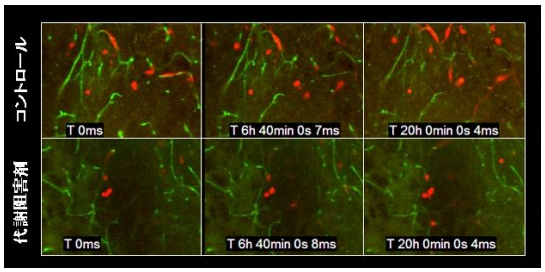

図３：　代謝阻害剤の投与によって、GSC（赤）の血管（緑）に沿った浸潤、GSC による血管の破壊も抑制された。

(3)　浸潤抑制剤と抗癌剤の併用投与プロトコールの確立

代謝阻害剤の中から同定した抗浸潤効果の高い薬剤については、現在、抗がん剤との併用による効果を検証している。GBM の移植モデルのみならず、マウスの自然発生モデルも使用し、投与量、投与スケジュールの最適化を行い、効果と毒性を判定する予定である。今後、動物における抗浸潤療法のプロトコール構築を行い、前臨床試験の準備を整える。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　5 件）

① Tsuchihashi K, Okazaki S, Ohmura M, Ishikawa M, Sampetrean O, Onishi N, Wakimoto H, Yoshikawa M, Seishima R, Iwasaki Y, Morikawa T, Abe S, Takao A, Shimizu M, Masuko T, Nagane M, Furnari FB, Akiyama T, Suematsu M, Baba E, Akashi K, Saya H and Nagano O: The EGF receptor promotes the malignant potential of glioma by regulating amino acid transport system xc(-). Cancer Res, 査読有, 2016, 76(10):2954-2963, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2121.

② Fukaya R, Ohta S, Yaguchi T, Matsuzaki Y, Sugihara E, Okano H, Saya H, Kawakami Y, Kawase T, Yoshida K and Toda M: MIF maintains the tumorigenic capacity of brain tumor-initiating cells by directly inhibiting p53. Cancer Res, 査読有, 2016, 76(9):2813-2823. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1011.

③ Kozono D, Li J, Nitta M, Sampetrean O, Gonda D, Kushwaha DS, Merzon D, Ramakrishnan V, Zhu S, Zhu K, Matsui H, Harismendy O, Hua W, Mao Y, Kwon CH, Saya H, Nakano I, Pizzo DP, VandenBerg SR and Chen CC: Dynamic epigenetic regulation of glioblastoma tumorigenicity through LSD1 modulation of MYC expression. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 112: E4055-4064, 2015 (doi: 10.1073/pnas.1501967112)

④ Ohmura M, Hishiki T, Yamamoto T, Nakanishi T, Kubo A, Tsuchihashi K, Tamada M, Toue S, Kabe Y, Saya H and Suematsu M: Impacts of CD44 knockdown in cancer cells on tumor and host metabolic systems revealed by quantitative imaging mass spectrometry. Nitric Oxide,査読有, pii: S1089-8603(14)00495-9, 2014 (doi: 10.1016/j.niox.2014.11.005)

⑤ Saito K, Iizuka Y, Ohta S, Takahashi S, Nakamura K, Saya H, Yoshida K, Kawakami Y and Toda M. Functional analysis of a novel glioma antigen, EFTUD1. Neuro-Oncology, 査読有, 16: 1618-1629, 2014 (doi:10.1093/neuonc/nou132)

〔学会発表〕（計　7 件）

① Sampetrean O: Heterogeneity and plasticity in brain tumor stem cells. The

Taiwan Pediatric Brain Tumor Symposium 2016 at TMUH, April 10th, 2016, Taipei (Taiwan), invited lecture

②佐谷秀行：がん幹細胞を標的とした治療戦略、第 56 回日本臨床細胞学会総会春期大会、2015 年 6 月 13 日、くにびきメッセ/松江テルサ（島根県松江市）、招請講演

③Saya H: Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. The 3rd Beijing International Symposium on Tumor Microenvironment., May 17th, 2015, Tsinghua University, Beijing (China), invited lecture

④佐谷秀行：悪性脳腫瘍　治療抵抗性の生物学、第 19 回日本脳腫瘍の外科学会、2014 年 9 月 12 日、東京ドームホテル（東京都文京区）、招待講演

⑤佐谷秀行：がん幹細胞の代謝特性、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

⑥ Saya H: Mechanisms of adaptive radioprotection in glioma stem cells, 20th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, July 21st 2014, Lake Tahoe (USA)

⑦佐谷秀行：脳腫瘍幹細胞の性状解析に基づく治療戦略の考案、第 32 回脳腫瘍病理学会、2014 年 5 月 24 日、あわぎんホール（徳島県徳島市）

〔図書〕（計　0 件）

〔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
http://genereg.jp/index.html

６．研究組織

⑴研究代表者
佐谷　秀行（SAYA HIDEYUKI）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：80264282

⑵研究分担者
サンペトラ　オルテア
（SAMPETREAN OLTEA）
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：50571113

⑶連携研究者
該当なし