

平成 26 年 4 月 2 日

平成 25 年度独立行政法人日本学術振興会  
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 筑波大学医学医療系・講師  
氏 名 石川 栄一

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 悪性脳腫瘍における血管内皮細胞関連分子を標的とした新規治療法の開発
(英文名)
2. 研究実施期間 平成 25 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日
3. 助成金額 1, 000, 000 円
4. 研究の目的 神経膠腫（グリオーマ）は、最も発生頻度の高い原発性脳腫瘍であり、その主たる組織型である神経膠芽腫において生存期間中央値はわずか 14.6 ヶ月と予後が悪い。特にグリオーマ幹細胞は、放射線治療や抗がん剤治療への抵抗性を保持するだけでなく、VEGF や CXCR4 などの血管新生関連分子を分化型のグリオーマ細胞より強く発現することで、腫瘍組織中に非常に発達した腫瘍血管を構築し、腫瘍増殖を高めていることが報告されている。更に、その腫瘍血管の一部はグリオーマ幹細胞から分化した細胞から構成されていることが報告されている。 がん幹細胞に特異的発現が見られ、生命予後とも相関することからケモカイン受容体である CXCR4 とそのリガンドである CXCL12 (SDF-1) は、がん幹細胞の研究分野で現在注目されている分子の一つである。腫瘍組織の CXCR4 発現が予後不良と相関することは、既に脳腫瘍、乳がん、肺がん、前立腺がん、そして、すい臓がんで報告されており、がん幹細胞の CXCR4 を介した腫瘍形成の重要性が示唆されている。動物実験においても、グリオーマ幹細胞の CXCR4 依存的な増殖が解析されており、グリオーマ幹細胞自身の増殖に関わる直接的な働きと血管新生を促進することで腫瘍増殖を促進する間接的な働きが報告されている。 しかし、これまでの研究において、グリオーマ幹細胞自身が分泌する CXCL12 による腫瘍形成の働きについては、詳細な解析が行われていない。そこで、グリオーマ幹細胞が発現する CXCL12 に着目し、その CXCL12/CXCR4 シグナルを介した直接的、間接的な腫瘍形成の働きを明らかにすることで、新規治療ターゲット分子となりうるかを検討するため、本研究を行った。

## 5. 研究概要報告

今回の研究では、グリオーマ幹細胞のモデル細胞として、TS細胞（INK4a/ARF<sup>+/+</sup>ノックアウトマウス由来の神経幹細胞にH-Ras<sup>v12</sup>遺伝子とGFP遺伝子を導入したグリオーマ幹細胞株）を用いた。

まず、グリオーマ幹細胞自身が分泌する CXCL12 による直接的な腫瘍増殖を解析するため、TS細胞に control siRNA と CXCL12 siRNA をそれぞれ遺伝子導入した。リアルタイム PCR 法により CXCL12 の発現抑制に効果的な配列を確認し、siRNA 遺伝子導入 72 時間後の細胞数をカウントしたところ、CXCL12 siRNA を遺伝子導入した TS 細胞群で有意な増殖抑制効果が見られた。CXCL12 siRNA と異なる配列を認識する CXCL12 shRNA を遺伝子導入した TS 細胞でも、同様の発現抑制効果と増殖抑制効果が見られた。更に TS 細胞による CXCL12 の影響を in vivo で解析するため、control shRNA と CXCL12 shRNA の遺伝子導入 TS 細胞株をそれぞれ作製し、C56BL/6 マウスに皮下投与して、腫瘍径の変化を測定したところ、in vivo においても TS 細胞の増殖抑制効果が見られた。

次に、グリオーマ幹細胞自身が分泌する CXCL12 の間接的な影響を解析するため、グリオーマ幹細胞による血管内皮細胞への分化能力を in vitro で評価した。TS 細胞を通常の分化因子である血清を含まない神経幹細胞用培地（neural stem cell medium : NSM）から血管内皮細胞用培地（endothelial cell medium : ECM）に培地を変えて培養後、チューブフォーメーションアッセイによる形態変化を解析したところ、TS 細胞を NSM から ECM に変えて 10 日間ほど事前培養すると、NSM では浮遊してスフェアを形成しているが、ECM 培地中ではシャーレに接着するような形態変化が見られ、チューブフォーメーションアッセイを行うと血管内皮細胞様の形態をとる事がわかった。更に、グリオーマ幹細胞の血管内皮細胞様への分化に CXCL12/CXCR4 シグナルが関わっているかを調べるため、CXCR4 のアンタゴニストである AMD3100 や CXCL12 shRNA によるシグナル阻害を行ったが、CXCL12/CXCR4 シグナルを阻害しても影響は見られなかった。

次に、in vivo での間接的な影響を調べるため、shRNA 株を投与した腫瘍組織からパラフィン包埋組織を作製し、血管新生関連分子である CXCL12、vWF、CD31 に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。CXCL12 で免疫染色したところ、腫瘍形成後も CXCL12 shRNA 株の組織では CXCL12 の発現が低い傾向が持続していた。また、血管新生を調べるため、血管内皮細胞のマーカー分子である CD31、vWF による免疫染色を行ったが、shRNA による違いは見られなかった。

これらの結果から、グリオーマ幹細胞は自身の CXCL12 を介して、直接的に細胞増殖を促進していると考えられる。一方、間接的な影響としては、グリオーマ幹細胞から血管内皮細胞への分化の点でも他の細胞による血管新生の点でも、グリオーマ幹細胞由来の CXCL12 は重要な働きは行っていないと考えられる。そのため、CXCL12 をターゲットとした治療薬は、グリオーマ幹細胞にのみ有効であり、増殖期間中、有効量を継続投与する必要があると考えられる。

## 6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：  
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 筑波大学 医学医療系 脳神経外科  
氏 名 石川 栄一

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。  
また、別刷り2部を必ず添付してください。

○発表者名 Uemae Y, Ishikawa E, Osuka S, Matsuda M, Sakamoto N, Takano S, Nakai K, Yamamoto T, Matsumura A  
テーマ名 CXCL12 secreted from glioma stem cells regulates their proliferation.  
発表誌名・巻号 Journal of Neuro-Oncology・117(1):43-51.  
発刊年月 2014年3月

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

○発表者名 上前洋二、石川栄一、大須賀覚、松田真秀、松村明  
テーマ名 CXCL12 regulates the proliferation of gliomastem cells independent of angiogenesis  
会合名 第72回日本癌学会学術総会  
発表年月日 2013年10月3日

○発表者名 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。  
テーマ名 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。  
会合名 第8回脳腫瘍の基礎シンポジウム  
発表年月日 2013年3月2日 (JSPS若手研究Bの時期の発表)

○発表者名 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  
テーマ名 マウス Brain Tumor-initiating Cell-line (BTICs)を用いた分子標的療法の開発、  
会合名 第30回日本脳腫瘍学会学術集会  
発表年月日 2012年11月25-27日 (JSPS若手研究Bの時期の発表)

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。  
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。