

平成 24 年 4 月 17 日

平成 23 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  
九州大学大学院医学研究院  
脳神経外科学講座・講師  
氏 名 中溝 玲

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<br>間葉系幹細胞の脳腫瘍病態生理に及ぼす影響の検討  |
| ( 英文名 )<br>Effect of mesenchymal stem cell on the pathophysiology of glioblastoma cell   |
| 2. 研究実施期間<br>平成 23 年 4 月 1 日 ~ 平成 24 年 3 月 3 1 日   |
| 3. 助成金額<br>1,000,000 円   |
| 4. 研究の目的<br>近年我々は、骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた新しい脳腫瘍治療法を開発し、1) 骨髄由来の間葉系幹細胞は脳腫瘍に対する指向性 tropism を有し、全身投与によっても脳腫瘍内に特異的に集簇すること、2) adenovirus を用いて IFN 遺伝子を間葉系幹細胞に組み込むことで、持続的に高濃度の IFN 産生させることに成功し、間葉系幹細胞が有効な delivery vehicle として利用できることを証明した。<br><br>ところが同研究では、間葉系幹細胞そのものは、実は、脳腫瘍細胞の増殖を助長する可能性が示唆されたが、当時はそのメカニズムに対する検討は行わなかった。しかし、臨床応用に向けては安全性を確立する必要がある、間葉系幹細胞の生物学的特性の解明、特に、マウスやラットの細胞株ではなくヒトの細胞での検討が必要である。<br><br>そこで、本研究では、ヒト神経膠芽腫とヒト間葉系幹細胞を用いて以下の3つの仮説を検証することを目的とする。<br><br>( 仮説 1 ) 間葉系幹細胞は、神経膠芽腫細胞の増殖を加速させる<br>( 仮説 2 ) 仮説 1 の効果は、間葉系幹細胞が分泌する液性因子による作用である<br><br>本研究は、間葉系幹細胞の本態の解明の手掛かりとなる可能性があり、また、その因子の発現を抑制する機構を開発することは、安全性の確立と治療効率の向上の一助となることが期待される。 |

## 5. 研究概要報告

### < 研究方法 >

#### 1. 間葉系幹細胞が神経膠芽腫細胞の増殖に及ぼす影響の検討 in vitro

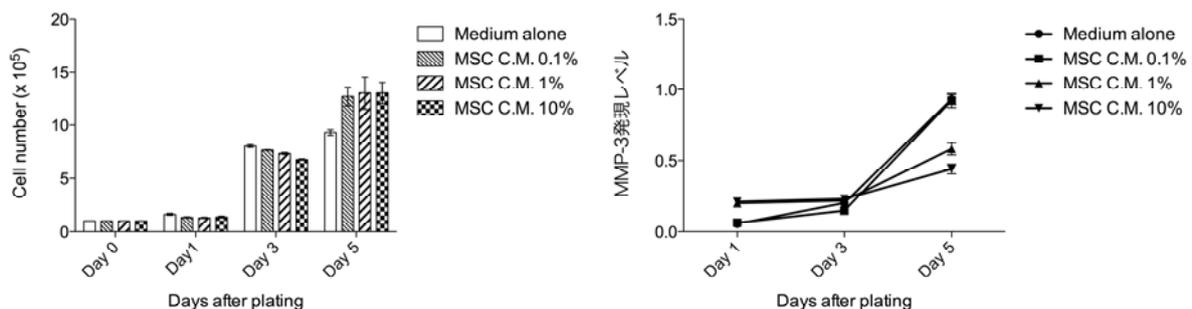
間葉系幹細胞が神経膠芽腫細胞の増殖に及ぼす影響を in vitro で検討する。5 x 10<sup>5</sup> 個の U87 ヒト神経膠芽腫細胞に種々の割合で間葉系幹細胞を混合し、6 cm dish に plate して 1、3、5 日に細胞数を計測して成長曲線を描くと、1:99 (間葉系幹細胞:神経膠芽腫細胞) の割合からすでに神経膠芽腫細胞の増殖が促進されていた。

この効果が、間葉系幹細胞が分泌する液性因子による作用であることを証明するために、以下の実験を行った。Plate した神経膠芽腫細胞の培養液に種々の割合で、間葉系幹細胞から採取した conditioned medium を加えて (培養液:間葉系幹細胞から得た conditioned medium = 100:0、99.9:0.1、99:1、90:10) 成長曲線を描いた。本実験でも共培養実験と同様に、間葉系幹細胞の conditioned medium により増殖が促進されていた (下図、左)。以上より、神経膠芽腫細胞の増殖が促進されたのは間葉系幹細胞の直接の作用ではなく、間葉系幹細胞が分泌する液性因子の作用によると考えられた。

#### 2. 間葉系幹細胞と神経膠芽腫細胞との細胞間 cross talk の存在の確認とその因子の同定

間葉系幹細胞が脳腫瘍に及ぼす増殖促進効果は、間葉系幹細胞そのものではなく、間葉系幹細胞から分泌された液性因子による作用、即ち、パラクラインによる細胞間 cross talk の可能性が示された。そこで間葉系幹細胞と U87 神経膠芽腫細胞の共培養 plate から得た上清を採取して、それに含まれる各種 cytokine、chemokine、growth factor の発現を ELISA 法にて測定することにより、神経膠芽腫細胞の増殖を加速させている液性因子を特定することを目的とした。bFGF、VEGF、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、G-CSF、GM-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17 の発現について検討した。間葉系幹細胞と U87 神経膠芽腫細胞を共培養すると、U87 細胞から分泌される matrix metalloproteinase (MMP)-2 と MMP-3 のタンパクレベルが有意に低下することが明らかとなった。

同様の実験を 1. の conditioned medium を用いた実験で得られた上清を用いて行った。間葉系幹細胞の conditioned medium の濃度依存性に MMP-3 の発現の抑制が見られた (下図、右)。Day1 における MMP-3 のタンパクレベルに conditioned medium 濃度依存性の差はみられないために、conditioned medium に含まれる何らかの液性因子によって、神経膠芽腫細胞からの MMP-3 分泌が抑制されると考えられた。IL-1 $\alpha$ 、VEGF についても間葉系幹細胞の conditioned medium 濃度依存性の発現レベルの低下が見られたが、MMP-1、13、IL-8、10、TGF- $\beta$ 、FGFb では見られなかった。



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 九州大学大学院医学研究院 脳神経外科学講座・講師  
氏 名 中溝 玲

論文発表  
なし

口頭発表  
なし

著 書  
なし

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。