

201212028A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

グロメルロイド血管制御ナノsiRNAによる膠芽腫の革新的治療戦略開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 狩野 光伸

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
グロメルロイド血管制御ナノsiRNAによる膠芽腫の革新的治療戦略開発	-----	1
狩野 光伸		
II. 分担研究報告		
1. siRNA搭載ナノ製剤の合成と開発	-----	5
岸村 顕広		
2. 生体外モデルの構築	-----	7
松崎 典弥		
3. 脳腫瘍組織の分子病理学的検討	-----	9
西原 広史		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	12

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

グロメルロイド血管制御ナノsiRNAによる膠芽腫の革新的治療戦略開発

研究代表者 狩野 光伸 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度が高いが、現状において有効な治療法はほぼなく、治療成績は依然として悪性腫瘍の中でも特に悪く、効果的な化学療法の開発が待たれる。近年、ナノ薬剤送達システム（ナノDDS）はがん治療において有効性を示しつつあるが、膠芽腫に対しては製剤設計のみではナノDDSの十分な薬効発揮は難しい。したがって、本研究では膠芽腫の特徴的病理構造、特にグロメルロイド血管（glomeruloid vessel, GV）に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指している。

研究分担者

岸村顕広・九州大学大学院工学研究院・准教授

松崎典弥・大阪大学大学院工学研究科・助教

西原広史・北海道大学大学院医学研究科・特任准教授

A. 研究目的

ヒトのもっとも悪性な脳腫瘍である悪性膠芽腫における特徴的血管構造であるグロメルロイド血管（GV）の妥当な実験系は現在存在しないため、これをヒト病理学的所見に照らしながら確立し、この実験系を用いてGV形成の責任分子を探索し、これら分子群に対するsiRNA配列を特定し、そのsiRNAを搭載したナノDDSをヒトにおける適用可能性を視野に入れつつ開発して、その効果を本研究において確立した実験系において確認する。

B. 研究方法

H24年度は、GV形成機構解明を行う本研究の目的にかなう膠芽腫モデル細胞株の選定を行った。我々はこれまでの研究から、GV血管では血管内皮細胞周囲の壁細胞集積が豊富であることを見出しており、これにより壁細胞の過剰増殖が血管バリア能を異常に強化している可能性が示唆された。そこで、本研究で用いる膠芽腫モデル細胞株の選定にあたっては、その細胞由来の分泌性因子が壁細胞分化を促進することを指標とした。当初計画で使用を予定していたTSRA細胞では十分な結果が得られず、これに代わる細胞株の選定を行う必要が生じたが、最終的に、ヒト膠芽腫病理像をよく反映する新たなモデル細胞株（TS-GFP細胞）を見出した。H24年度はこのTS-GFP細胞を用いた膠芽腫動物モデルの作製や、GV形成を司るシグナル分子の候補特定とGV制御に最も効果的な治療標的分子群の同定を進めた。治療標的分子群としては、GV形成に対し促進的に働く腫瘍由来因子に着目し、同定を試みた。本研究では主に老化関連分泌因子群（Senescence-associated secretory proteins, SASPs）に着目しているが、H24年度の解析の結果、TS-GFP

細胞ではSASPs分子群が高く発現していることが確認された。さらに、GV構成細胞に対し適切なsiRNA搭載用ナノ粒子を構築するため、治療標的候補分子に対する発現抑制効率の高いsiRNA配列の決定を行った。

(倫理面への配慮)

患者の病理検体に関して：本研究で用いられる病理検体はすべて研究開始前に研究分担者により北海道大学において人体から採取された試料であり、患者個人に不利益・危険性が及ぶことはない。人権擁護の観点から原則として研究開始前までに当該患者から試料の利用に係る同意を受けるものとし、同意を受けることが出来ない場合には臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）に基づいて、当該機関の倫理委員会 で得られている本研究課題の承認内容に基づき、組織代表者の許可を得る。また、成果発表等の際には個人の特定が行われないよう最大限の配慮をなす。

動物実験に関して：本研究課題で行う動物実験については、各所属機関の動物実験施設の動物生命倫理に関する審査委員会に申請し、承認を得て行う。全ての動物は本学ガイドラインに基づいて愛護的に扱い、実験に際して苦痛は最小限になるよう努め、殺処分の際は安楽死させるようにする。

C. 研究結果

H24年度は、まず計画に従いTSRA細胞 (Sasai et al, *Molecular Cancer*, 2007) を膠芽腫モデル細胞として利用し、GV形成に関与する膠芽腫由来のシグナル分子群の同定を進めた。まず、本細胞に由来する液性因子が血管壁細胞 (pericyte, PC) の分化度に与える影響について *in vitro* において検討を行った。具体的には同細胞の培養上清によりマウス間葉系幹細胞10T1/2細胞を培養し、定量的PCRにより各種PCマーカー分子の発現変動を解析した。その結果、NG2、CD13などのPCマーカー発現の増加が示されたが、より一般的なPCマーカーとされるSMA、PDGFR β の発現上昇は十分ではなかった。また、*in vivo* の検討も並行して開始を試みたところ、このTSRA細胞を動物へ脳内移植した場合の生着率・腫瘍形成効率が報告ほど十分でなく、従って本研究遂行にさらに適切な細胞株を探索する必要が生じた。検討

の結果、TS-GFP細胞 (Sampetean et al, *Neoplasia* 2011) を用いることとした。報告によれば同細胞株による同所腫瘍の病理組織はGV様構造を呈するが、同報告においてPCマーカー発現までは解析されていなかった。そこで、まず *in vitro* 実験を行った結果、同細胞の培養上清により10T1/2におけるNG2、CD13、SMA、PDGFR β すべての発現上昇が認められた。一方、*in vivo*、すなわちTS-GFP細胞の同所移植標本を組織学的に解析した結果、GV様の構造はヒト同様にSMA陽性細胞が他モデルに比較し厚く血管周囲を覆っていることが示された。さらにTS-GFP細胞における各種SASPsの発現についても定量的PCRにより評価を行った。その結果、TS-GFP細胞ではVEGFA、PAI1、IL-6、EGFなどのSASPs遺伝子群が高く発現していることが示された。さらに既存データベースを用いた *in silico* 解析により、膠芽腫予後と各種SASPs分子発現量の相関について解析を行った結果、SASPsであるMMPs、EGF、CXCLs等の発現量が膠芽腫予後と有意に相関することが示唆された。以上より、TS-GFP細胞中から分泌されるSASPsが壁細胞分化に影響をもたらすこと、すなわちSASPsがGV抑制の標的候補として妥当であることが改めて示唆され、GV抑制による膠芽腫予後改善を試みるモデル細胞としてTS-GFP細胞が有用であることも確認された。そこで主にこれらSASPsの発現を抑制するsiRNA配列の決定を行った。また、既存データベースを用いた *in silico* 解析をさらに進めた結果、膠芽腫予後に優位に相関する壁細胞関連分子を複数見出している。いずれの分子についても発現抑制siRNA配列の決定が進行中である。これらのsiRNAは、H25年度に東京大学大学院工学系研究科において開発されているナノ担体に搭載し、TS-GFP細胞の脳内同所移植モデルに投与して *in vivo* における効能を検討する予定である。

D. 考察

本研究では、従来とは異なるアプローチによる膠芽腫の画期的な化学療法確立を目指している。これまでに治療標的として着目されたことのないグロメロイド血管 (glomeruloid vessel, GV) に焦点を当て、ナノ粒子を用いたsiRNAの送達によりGVにおける漏出性を制御することで、腫瘍組織全体への薬剤送達効率を改善することを目指している。我々はこれまでの研究においてGVに着目した

解析を行い、GVは一層の内皮細胞およびそれを取り囲む多層のPCから構成されることを確認し、組織中にGVが多い症例は予後不良であることを明らかにしている。また膠芽腫以外の腫瘍ではPC抑制によりナノDDS治療効率が大きく改善されることを腫瘍ほかで実証してきた。したがって、GVを標的とすることで、国民の死因の第一位であるがんの中でも特に治療が困難な膠芽腫において、化学療法の効能および患者QOLの大幅な改善をもたらすことができると確信される。また本研究のアプローチ、すなわちSASPsと関連する病巣血管構築の制御を通じた治療法開発の試みは他に類を見ないものであるが、SASPs自体は腫瘍のみならず各種難治炎症性疾患への関与が指摘されており、本研究を通じ得られる知見は他難治疾患に対しても将来的に応用性を示しうるものである。

以上の目的を鑑み、H24年度にGV形成機構解明のためによりふさわしい細胞株であるTS-GFP細胞の選定に至ることができたのは大きな前進であったといえる。ヒト病理と同様にGVを形成する膠芽腫動物モデルがほとんど存在しない中、TS-GFP細胞は、他の膠芽腫細胞株に比べてよりヒトGVに近い血管構築を示す非常に有用なモデル細胞であり、新規治療法開発にあたっては非常に有用である。一方、H24年度には研究の加速を図るためにヒト膠芽腫に関する既存データベースを用いた*in silico*解析手法を確立した。当初計画には*in silico*解析は含まれなかったが、着手した結果、GV抑制にあたり有力な候補分子の同定に至っている。このように、ヒト膠芽腫病理を反映するモデル細胞とヒト病理検体を元としたデータベースによる*in silico*解析の併用による新規治療法の開発が多疾患においても一般化されれば、新薬開発において有力な手段となると考えられる。また、H24年度にはTS-GFP細胞を用いたGVの*ex vivo*モデルの作製にも着手した。同モデルの作製およびその解析を通じ、GVの形成機構の解明や、GVの形成を標的とした治療法の初期的検討を行うことが期待される。

E. 結論

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度が高いが、現状において有効な治療法はほぼなく、治療成績は依然として悪性腫瘍の中でも特に悪く、効果的な化学療法の開発が待たれる。近年、ナノ薬剤送達システム(ナ

ノDDS)はがん治療において有効性を示しつつあるが、膠芽腫に対しては製剤設計のみではナノDDSの十分な薬効発揮は難しい。したがって、本研究では膠芽腫の特徴的病理構造、特にグロメルロイド血管(glomeruloid vessel, GV)に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指している。

本年度は下記の進展があった。

1. GV形成責任シグナル分子群の同定：

計画に沿いTSRA細胞(Sasai et al, Molecular Cancer, 2007)を膠芽腫モデル細胞として用い、*in vitro*でGV形成の責任シグナル分子群の同定を進めた。本細胞に由来する因子が、血管周皮細胞(pericyte, PC)の分化度に与える影響を同細胞の培養上清と間葉系幹細胞とされる10T1/2細胞を用いて*in vitro*で調べ、NG2、CD13など一部のPCマーカー発現の増加が示された。次に2. で述べる理由で、TS-GFP細胞(Sampetean et al, Neoplasia 2011)を用いたところ今度は10T1/2にて一般的にPCマーカーとされるNG2、CD13、SMA、PDGFR β すべての発現上昇が認められた。さらにTS-GFP細胞における各種SASPsの発現について定量的PCRにより評価し、SASPs遺伝子群(特にEGF, CXCLs)がTS-GFP細胞では高く発現していることが示された。以上よりSASPsがGV抑制の標的候補であることが改めて示唆された。

2. GV実験系の確立：

前項で述べたTSRA細胞を動物へ脳内移植した場合の生着・腫瘍形成効率が報告ほど十分でなく、さらに適切な細胞株を探索する必要性が生じた。検討の結果、前述のTS-GFP細胞を用いることとした。報告によれば同細胞株による同所腫瘍の病理組織はGV様構造を呈するが、実際にPCマーカー発現までは解析されていなかった。その同所移植標本の染色解析の結果、GV様の構造はヒト同様にSMA陽性細胞が他モデルに比較し厚く血管周囲を覆っていることが示された。これに基づき三次元培養系の構築にも着手した。

3. siRNA搭載PICsomeの開発：

本年度は、siRNAを用いて作るPICsomeの作製(siRNAsome)と、VEGFノックダウン効果の*in vitro*実験系における確認がなされた。またsiRNAsome安定化に寄与するポリマーの新規開発および細胞に大量導入しうるためのPICsomeの物性の検証を行った。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kokuryo D, Anraku Y, Kishimura A, Tanaka S, Kano MR, Kershaw J, Nishiyama N, Saga T, Aoki I, Kataoka K. SPIO-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPIO-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsome s). *J Control Release*. 2013 in press.

Wu S, Kasim V, Kano MR, Tanaka S, Ohba S, Miura Y, Miyata K, Liu X, Matsushashi A, Chung UI, Yang L, Kataoka K, Nishiyama N, Miyagishi M. Transcription factor YY1 contributes to tumor growth by stabilizing hypoxia factor HIF-1 α in a p53-independent manner. *Cancer Res*. 2013;73(6):1787-99.

Harada M, Iwata C, Saito H, Ishii K, Hayashi T, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Kato Y, Kano MR. NC-6301, a polymeric micelle rationally optimized for effective release of docetaxel, is potent but is less toxic than native docetaxel in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2713-27.

Zhang L, Nishihara H, Kano MR. Pericyte-coverage of human tumor vasculature and nanoparticle permeability. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(5):761-6.

2. 学会発表

Kano MR. Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases. 第90回日本生理学会大会 2013年3月28日、東京

狩野光伸 腫瘍血管構築とナノ薬剤 第20回日本血管生物医学会学術集会 2012年12月7日、徳島

Kano MR. Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases. 2012年11月5日-8日、IEEE nanomed 2013, Bangkok, Thailand

狩野光伸 腫瘍血管のナノ病態生理学 第29回日本DDS学会 2012年7月4日-5日、札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

現在該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

siRNA搭載ナノ製剤の合成と開発

研究分担者 岸村 顕広 九州大学大学院工学研究院准教授

研究要旨

膠芽腫は、最も悪性度が高い脳腫瘍である。しかし有効な治療法はほぼない現状であり、効果的な化学療法の開発が必要な状況である。近年、ナノ薬剤送達システム（ナノDDS）はがん治療において有効性を示しつつあるが、膠芽腫に対しては製剤設計のみではナノDDSの十分な薬効発揮は難しく、本研究では膠芽腫に特徴的なグロメルロイド血管に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指す。

本分担研究では、この研究開発において、siRNAを搭載したナノ粒子を、既に発表しているPICsomeの構築技術を基に進めることを目指した。

A. 研究目的

我々は近年、ポリイオンコンプレックスのベシクルによりナノサイズを持つ粒子を合成してきた（Nano-PICsomes）。この粒子は、水性溶液中で、静電相互作用により陰性荷電・陽性荷電2種のポリイオンが自己会合することによって形成される。この粒子を架橋するとマウスにおいて長時間の血中滞留性を示し、よって医学応用が期待される。

本研究ではこのポリイオンコンプレックスのうち陰性荷電のものをやはり陰電荷をもつsiRNAで代用することによって、PICsomeの膜自体にsiRNAを埋め込むことができることを示した（siRNAsomes）。正電荷の側はポリエチレングリコール（PEG）ブロックカチオマーを用いた。

B. 研究方法

21塩基配列を持つGL3-siRNAと、Poly(ethylene glycol)-poly([5-aminopentyl]- α,β -aspartamide) (PEG-P(Asp-AP)₇₀) を水性溶液中で混ぜ、siRNAsomeを形成する。これをグルタルアルデヒドにより架橋して、物理化学的、あるいは生物学的評価を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験に関して：本研究課題で行う動物実験については、各所属機関の動物実験施設の動物生命倫理に関する審査委員会に申請し、承認を得て行う。全ての動物は本学ガイドラインに基づいて愛護的に扱い、実験に際して苦痛は最小限になるよう努め、殺処分の際は安楽死させるようにする。

C. 研究結果

形成されたsiRNAsomeの粒径を動的光散乱法（DLS）にて測定すると、およそ110nmであった。また粒子を透過型電子顕微鏡で観察すると、球状の粒子を形成していることが確認された。

次に、ルシフェラーゼ導入細胞株を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子に対するsiRNA配列を組み込んだsiRNAsomeによるノックダウン効率を検討した。この結果、同遺伝子の発現量を約半分に抑制した。

このsiRNAsomeについて、150mM NaCl溶液中、またはそれに10%FBSを加えた溶液中での挙動を、架橋をしたもので確認すると、いずれにおいてもサイズやPDI値の変化は見られなかった。これにより、塩・血清中での安定性が確認された。

次に細胞による取り込みを、蛍光標識siRNAを用いて確認したところ、siRNA単独または架橋なしのsiRNAsomeでは取り込みがほぼ認められなかった一方で、架橋を行ったsiRNAsomeでは細胞内後期エンドソームとの共存が認められ、細胞へ取り込まれたことが確認された。

続いて血管新生に重要なシグナルであるVEGFのノックダウン配列を持つsiRNAを用いてsiRNAsomeを作成し、その効果を培養細胞において検討した。この結果、最大約1/3まで発現量の抑制が認められた。

D. 考察

siRNAsomeは少なくともin vitroにおいて、遺伝子の抑制効果も確認され、ツールとしての有効性が示唆されたと考える。ただし今後は本siRNAsomeの動物における遺伝子抑制効果の確認が必要である。

この観点から、本研究の残り期間を勘案して、すでに企業導出済みの技術であり、動物移植腫瘍においても遺伝子発現抑制効果を確認済みであるsiRNA送達用ナノデバイス、cRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリシン (R.J. Christie et al, *Biomacromolecules*, 12, 3174-3185 (2011); R.J. Christie et al, *ACS Nano*, 6, 5174-5189 (2012)) を用いた検討を並行する。

E. 結論

siRNAsomeは適切な架橋により粒径分散少なく合成可能である。このsiRNAsomeは塩または血清に対しても安定であり、また細胞への取り込みも確認された。さらに、このsiRNAsomeによって、遺伝子の抑制効果も確認され、ツールとしての有効性が示唆された。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記入。)

G. 研究発表

1. 論文発表

本関連内容については、今年度該当なし。

2. 学会発表

A. Kishimura, Y. Anraku, S. Chuanoi, W. Kawamura, S. Kakiyama, and K. Kataoka, Development of Novel Polyion Complex Vesicles, "PICsomes", and Their Biomedical Applications. CIMTE C 2012-4th International Conference "Smart Materials, Structures and Systems", June 14th, 2012, Montecatini Terme, Italy.

A. Kishimura, Y. Anraku, S. Chuanoi, K. Miyata, D. Kokuryo, I. Aoki, T. Saga, K. Kataoka, Development of Polyion Complex Vesicles "PICsomes" toward a Versatile Platform for Delivery of Biomacromolecules and Nano-materials. The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 16th, 2012, Centre des congrès de Québec, Québec City, Canada, Poster Presentation.

S. Chuanoi, A. Kishimura, K. Miyata, T. Suma, Y. Anraku and K. Kataoka, Novel vesicles containing membrane-embedded siRNA as for nucleic acid therapeutics. International Union of Materials Research Societies - International Conference on Electronic Materials (IUMRS-ICEM 2012), Sep. 26th, 2012, PACIFICO Yokohama, Yokohama, Japan. Poster presentation.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

いずれも該当なし。

生体外モデルの構築

研究分担者 松崎 典弥 大阪大学大学院工学研究科助教

研究要旨

本研究では、glomeruloid vessel (GV) を標的として膠芽腫における薬剤送達性を改善する新規治療法を確立するための3次元共培養法に関する技術基盤の構築を行う。これまでに開発を行ってきた三次元多層化共培養法 (Matsusaki et al, Angew. Chem. Int. Ed., 2007) を導入し、GV病態の生体外における再現を目指す。H24年度は、膠芽腫モデル細胞TS-GFP細胞由来の培養上清によりマウス間葉系幹細胞10T1/2を分化させ、多層化を試みた。検討の結果、分化した10T1/2の多層化条件の決定に成功している。

A. 研究目的

これまでに、我々は複数種細胞の混在した細胞を多層化して培養を行う三次元培養法の開発を行ってきた。細胞表面に細胞外基質 (ECM) によるナノスケールの薄膜 (ECMナノ薄膜) 形成を行って細胞を多層化する積層培養法 (Matsusaki et al, Angew. Chem. Int. Ed., 2007) のほか、単一細胞に直接ECM薄膜を形成させて多層化する細胞集積法 (Nishiguchi et al., Adv.Mater., 2011) を用いて新生血管網を構築する技術をすでに確立している。本研究では、これらの技術を用い、肥厚したGV組織構築を生体外で反映した三次元培養系の構築を行う。

GVの肥厚した構造は、長く血管内皮が異常増殖したものと考えられてきたが、近年の研究により、内皮細胞ではなく血管周囲の壁細胞が主体であることが明らかになった。そこで本研究では、腫瘍細胞と壁細胞を含んだ三次元培養系の確立を目指す。

B. 研究方法

H24年度はまず、壁細胞の前駆細胞となるマウス間葉系幹細胞 (10T1/2細胞) に対し、マウス膠芽腫細胞 (TS-GFP細胞) の培養上清により分化誘導を行い、その後積層培養法 (Matsusaki et al, Angew. Chem. Int. Ed., 2007) を応用して細胞を多層化して三次元培養を行った。

初めに、TS-GFP細胞培養上清の回収を行った。TS-GFP細胞をNSM培地 (DMEM/F-12 1:1混合培地に、B27添加物、および各20ng/mlのbFGF、EGF、Heparan Sulfateを添加したもので72時間培養し、その

培養液を3500rpm、4℃、5分間遠心した上清を、TS-GFP培養上清として回収した。

並行して、10T1/2細胞の前培養をBME培地 (10%ウシ胎児血清を添加したもので行った。前培養の後、前述のとおり得たTS-GFP培養上清で24時間または48時間培養し、分化誘導を行った。

以上のように分化誘導を行った10T1/2細胞 (dif10T1/2細胞) を用い、細胞集積法 (Nishiguchi et al, Adv. Mater., 2011) により三次元培養を行った。ECMナノ薄膜の形成は、collagen type IVとlaminin、またはfibronectinとgelatinの組み合わせで試みた。ECMナノ薄膜形成を行ったdif10T1/2細胞を、 1×10^5 個、 5×10^5 個、または 1×10^6 個それぞれ12穴プレートカルチャーインサート上に播種し、12時間から48時間三次元培養を行った。

これらの三次元培養dif10T1/2細胞を4% PFAで固定処理後パラフィン包埋ブロックを作成し、三次元培養組織の多層化断面が観察面となるよう薄切してHE染色を行い、三次元培養組織の観察を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関して: 本研究課題で行う動物実験については、各所属機関の動物実験施設の動物生命倫理に関する審査委員会に申請し、承認を得て行う。全ての動物は本学ガイドラインに基づいて愛護的に扱い、実験に際して苦痛は最小限になるよう努め、殺処分の際は安楽死させるようにする。

C. 研究結果

HE染色の施された三次元培養組織観察の結果、fib

ronectinとgelatinによりECMナノ薄膜を形成させたd10T1/2細胞を、1ウェルあたり 1×10^6 個播種した条件において多層化が確認できた。培養時間は、今回検討を行った中では48時間が最も組織的には安定していた。今回の条件により得られた三次元培養細胞層数は、解析部位により2-4層と幅があり、予想の4層より少ない結果であったが、播種細胞数の増加や積層培養法と細胞集積法の併用により改善を見込めるため、解決可能であると考えている。

D. 考察

今回は、全行程でNSM培地を一貫して使用したが、他細胞種の三次元培養時ではDMEM培地で安定した結果を得ている。今後は10T1/2の分化誘導時には今回のようにNSM培地で行い、三次元培養時に培地を変更することを考えている。

また、実用化を勘案し、今後は前培養や分化誘導の時間を短縮化し、効率化を図る必要があると考えている。

E. 結論

本年度の検討により、分化誘導を行った10T1/2細胞に関しても多層化三次元培養が可能であることが明らかになり、また三次元培養の条件をほぼ確定できた。今後は、10T1/2細胞の多層化について安定した細胞層数が得られる条件を決定し、その上下にTS-GFP細胞や血管内皮細胞をも重ね、GVの組織構造を反映した三次元培養系を構築する。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記入。)

1. 論文発表

1. P. Chetprayoon, K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, Survival and Structural Evaluations of Three-Dimensional Tissues Fabricated by Hierarchical Cell Manipulation Technique, *Acta Biomaterialia* 9, 4698 (2012).

2. J. Sasaki, T. Matsumoto, H. Egusa, M. Matsusaki, A. Nishiguchi, T. Nakano, M. Akashi, S. Imazato, H. Yatani, In

vitro reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct, *Integrat. Biol.*, 4, 1207 (2012).

3. S. Shinohara, T. Kihara, S. Sakai, M. Matsusaki, M. Akashi, M. Taya, and J. Miyake, Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel, *J. Biosci. Bioeng.*, accepted (February 21, 2013).

2. 学会発表

1. M. Matsusaki, "In Vitro Creation of 3D-Human Tissue Models", International Workshop on Biointerface Engineering 2013, Okayama University, March 13, 2013.

2. 吉海 卓、西口昭広、松崎典弥、明石 満、"ナノ薄膜形成による細胞表面の高機能化と細胞-薬剤同時送達システムの創製"、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、仙台国際センター、2012年11月27日

3. 西口昭広、松崎典弥、明石 満、"単一細胞表面へのナノECM薄膜形成に基づく血管・リンパ管網導入三次元組織の構築と臓器モデルへの応用"、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、仙台国際センター、2012年11月27日

4. 西口昭広、松崎典弥、Charles P. Case, 明石 満、"交互積層ナノ薄膜による毛細血管モデルの構築と毒性評価モデルへの応用"、第61回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2012年5月31日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 特許第5130376号

発明者：松崎典弥・明石 満・岡野和宣

発明の名称：三次元細胞培養体の生体シグナルの検出方法及び検出キット

出願人：独立行政法人科学技術振興機構

登録日：2012年11月9日

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

脳腫瘍組織の分子病理学的検討

研究分担者 西原 広史 北海道大学特任准教授

研究要旨

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度が高く、現状において有効な治療法はほぼ存在しない。本研究では膠芽腫の特徴的病理構造、特にグロメルロイド血管 (glomeruloid vessel, GV) に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指しており、本分担研究では、ヒト・実験動物由来の各種病理標本を、実験・診断病理学的観点から解析する。また、脳腫瘍細胞株の提供を行う。

A. 研究目的

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度が高く、有効な治療法はほぼ存在しない状況が続き、生存率・患者 QOL も低いままにとどまる。患者 QOL の向上を図るためにも、効果的な化学療法の確立が待たれている。本研究で我々は、治療標的として膠芽腫に特徴的な病理構造の一つである glomeruloid vessel (GV) に着目した。GV は血管が異常に肥厚した病理組織で、その実態については未解明であったが、我々は GV の主体が過剰に増殖した血管周皮細胞 (PC) であることを確認し、さらに GV の程度と予後が逆相関することを明らかにしてきた。そこでこの GV 形成過程と構造的特徴を分子レベルで明らかにし、GV の抑制に効果的なシグナル経路を同定する必要があると考える。

GV を標的とした膠芽腫治療の試みは世界的にも前例がない。本研究では 3 次元共培養法 (Matsusaki et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007) を導入し、生体外における病態の再現を行い、古典的病理学と分子生物学・ナノ技術の融合による学問包括的な治療法の開発を試みる予定であるが、この際に、より臨床的妥当性を持ったモデルとするために対応するヒト病理との情報のリンクは重要である。これにより、従来は難しかった病理組織と多細胞間分子シグナル伝達・薬剤送達性の詳細な関連付けが

初めて可能になる。

このような背景を踏まえて、本研究に臨床病理学的視点を与えることが本分担研究の目的である。

B. 研究方法

分担研究者が所属する北海道大学はこれまで長くにわたり脳腫瘍の病理学研究を進めてきたことから、脳腫瘍患者から採取された試料が極めて豊富に存在する。こうしたヒト由来の病理標本、または研究代表者により実験動物から採取された試料について、CD31, CD34といった血管内皮細胞を認識する分子マーカー、あるいはSMA, PDGFRbといった血管壁細胞を認識する分子マーカーを用いて染色し解析した。

また、血管壁細胞マーカーが確定していない状況に鑑み、そのほかのマーカーも探索した。本年度はRGS5の染色を試みた。

他方で、所属教室で所有する脳腫瘍細胞株について有効なものを検索し、ヒト正常アストロサイトNH A, またこれに腫瘍化因子を導入した、TS (TERT, SV40), TSR (Ras追加), TSRA (Akt追加)の4種の細胞株について研究代表者に提供しまた確認を行った。

(倫理面への配慮)

患者の病理検体に関して、本研究で用いられる病理検体はすべて研究開始前に北海道大学において人体から採取された試料であり、患者個人に不利益・危険性が及ぶことはない。人権擁護の観点から原則として研究開始前までに当該患者から試料の利用に係る同意を受けるものとし、同意を受けることが出来ない場合には臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）に基づいて、北海道大学の倫理委員会で得られている本研究課題の承認内容に基づき、組織代表者の許可を得る。また、成果発表等の際には個人の特定が行われぬよう最大限の配慮をなす。本研究課題で行う動物実験については、各所属機関の動物実験施設の動物生命倫理に関する審査委員会に申請し、承認を得て行う。全ての動物は本学ガイドラインに基づいて愛護的に扱い、実験に際して苦痛は最小限になるよう努め、殺処分の際は安楽死させるようにする。

C. 研究結果

ヒト病理標本のさらなる染色において、グロメルロイド血管は、血管腔周囲の一層の内皮細胞の他は、SMA（平滑筋アクチン）およびPDGFRb（PDGF受容体b）が陽性の、血管壁細胞とみなすことが可能な細胞によって構成されることが確認された。

新規の血管壁細胞マーカーとしてのRGSS5については、SMA、PDGFRbと同様の染色傾向を示したものの、染色におけるバックグラウンドが下がりきらず、有効な染色像を呈するには至っていない。他の抗体を試用する必要が考えられる。

研究代表者に提供した細胞株NHA、TS、TSR、TSRAについては、培養においては血管壁細胞との共培養にて血管壁細胞の増殖をTSRA細胞が促進し、その説明因子をマイクロアレイの結果として示唆するなど大きな役割を果たした。しかし、同所・異所移植とも、動物移植において有効な腫瘍増殖が見られることがなかった。このため、今回新たに導入するTS-GFP細胞の比較対照にとどめることとする。

他方、この結果に基づいて新たに導入された、TS-GFP細胞株を用いた動物移植腫瘍（同所）より採取した病理標本について、免疫染色を行い、評価した。この結果、TS-GFP細胞株により動物内で形成される血管については、血管壁細胞分子マーカー陽性の

細胞群が血管内皮細胞の周囲に厚く存在することが判明した。

D. 考察

ヒト病理の情報から、グロメルロイド血管の構築は、一層の血管内皮細胞と、血管壁細胞または何らかの間葉系細胞が厚く増殖したものであることが示唆される。このヒト病理からの知見に対応するモデルとして、動物モデルとしてはTS-GFP細胞の同所移植によるモデルが妥当であると判断される。またこの情報に基づいた、三次元培養系の構築が期待される。

E. 結論

グロメルロイド血管は、血管内皮細胞と、血管壁細胞または何らかの間葉系細胞が厚く増殖したものであることが、ヒト病理の情報から示唆されるが、このヒト病理からの知見に対応する実験系を用いて本研究を進行させることが重要である。この観点から動物モデルとしてはTS-GFP細胞の同所移植によるモデルが妥当であると判断される。またこの情報に基づき、TS-GFPを用いた三次元培養系の構築を進めることは妥当である。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記入。)

G. 研究発表

1. 論文発表

Muraki C, Ohga N, Hida Y, Nishihara H, Kato Y, Tsuchiya K, Matsuda K, Totsuka Y, Shindoh M, Hida K. Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells. *Int J Cancer*. 2012;130(1):59-70.

Yanagi H, Wang L, *Nishihara H, Kimura T, Tanino M, Yanagi T, Fukuda S, Tanaka S. CRKL plays a pivotal role in tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma through the regulation of cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(1):104-9.

Hosoya H, Kadowaki K, Matsusaki M, Cabral H, Nishihara H, Ijichi H, Koike K, Kataoka K,

Miyazono K, Akashi M, Kano MR. Engineering fibrotic tissue in pancreatic cancer: A novel three-dimensional model to investigate nanoparticle delivery. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;419(1):32-7.

Yamaguchi S, Kobayashi H, Terasaka S, Ishii N, Ikeda J, Kanno H, Nishihara H, Tanaka S, Houkin K. The Impact of Extent of Resection and Histological Subtype on the Outcome of Adult Patients with High-grade Gliomas. *Jpn J Clin Oncol.* 2012. In press.

Yuzawa S, Kano MR, Einama T, Nishihara H. PDGFR β expression in tumor stroma of pancreatic adenocarcinoma as a reliable prognostic marker. *Med Oncol.* 2012;29(4):2824-30.

Zhang L, Nishihara H, Kano MR. Pericyte-coverage of human tumor vasculature and nanoparticle permeability. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(5):761-6.

Kohsaka S, Wang L, Yachi K, Mahabir R, Narita T, Itoh T, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S. STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(6):1289-99.

Kanno H, *Nishihara H, Narita T, Yamaguchi S, Kobayashi H, Tanino M, Kimura T, Terasaka S, and Tanaka S. Prognostic implication of histological oligodendroglial tumor component: Clinicopathological analysis of 111 cases of malignant gliomas. *PLoS One.* 2012;7(7):e41669. Epub 2012 Jul 24.

Kanno H, Tanino M, Watanabe K, Ozaki Y, Itoh T, Kimura T, Nishihara H, Itoh T, Narita T, Nagashima K, Tanaka S. Intracranial mass-forming lesion associated with dural

thickening and hypophysitis. *Neuropathology.* 2012 in press

Kato Y, *Nishihara H, Yuzawa S, Mohri H, Kanno H, Hatanaka Y, Kimura T, Tanino M, Tanaka S. Immunohistochemical molecular expression profile of metastatic brain tumor for potent personalized medicine. *Brain Tumor Pathol.* 2012 in press

Kato Y, *Nishihara H, Mohri H, Kanno H, Kobayashi H, Kimura T, Tanino M, Terasaka S, Tanaka S. The clinicopathological evaluation of cyclooxygenase-2 expression in meningioma: immunohistochemical analysis of 76 cases of low- and high-grade meningioma. *Brain Tumor Pathol.* 2013 *In press.*

Kanno H, *Nishihara H, Wang L, Yuzawa S, Kobayashi H, Tsuda M, Kimura T, Tanino M, Terasaka S, and Tanaka S. Expression of CD163 prevents apoptosis through the production of granulocyte colony-stimulating factor in meningioma. *Neuro-Oncology* 2013 *In press.*

Kohsaka S, Takahashi K, Wang L, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S. Inhibition of GSH synthesis potentiates temozolomide-induced bystander effect in glioblastoma. *Cancer Lett.* 2013;331(1):68-75.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

3. その他
該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

現在該当なし (投稿準備中)

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

現在該当なし (投稿準備中)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

