

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 狩野 光伸

平成26(2014)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	----- 2
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	----- 7
岸村 顕広	
2 . 生体外モデルの構築	----- 9
松崎 典弥	
3 . 脳腫瘍組織の分子病理学的検討	----- 13
西原 広史	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 15

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腫瘍である。しかし、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い。このため、効果的な化学療法の開発が待たれる状況である。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、膠芽腫に対しては未だにナノDDSの十分な薬効発揮は難しい状況である。この状況に鑑み、本研究では膠芽腫の特徴的病理構造、特にグロメロイド血管（glomeruloid vessel, GV）に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指した。

研究分担者

岸村顕広・九州大学大学院工学系研究科・准教授

松崎典弥・大阪大学大学院工学系研究科・助教

西原広史・北海道大学大学院医学研究科・特任准教授

着目されてこなかった。従って妥当な実験系も存在していない。これをヒト病理学的所見に照らしながら確立し、主にGVに含まれるPCを治療標的として、その血管内皮細胞（endothelial cells, EC）への接着や成熟を抑制する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た。

A．研究目的

我々はこれまでの研究から、グロメロイド血管（GV）では血管内皮細胞周囲の壁細胞（pericyte, PC）集積が豊富であることを見出しており、これによりPC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を仮説とした。この仮説に基づき、本研究では膠芽腫組織内におけるPCを抑制することでGV形成を回避しうる可能性を考えた。

GVは、ヒト脳腫瘍のなかでもっとも悪性度が高い悪性膠芽腫における特徴的血管構造である。しかしながら、その機能的側面にはこれまでほとんど

B．研究方法

H25年度は、H24年度に選定した膠芽腫モデル細胞株（TS-GFP細胞）を用いてGV形成に関する評価を行った。

始めに、TS-GFP細胞(Sampetean et al, *Neoplasia* 2011)によるマウス移植モデルにおけるGV様構造の解析を行った。TS-GFP細胞は、これまでの報告においては頭蓋内移植モデルにより検討が進められてきた。我々もH24年度に同モデルの同所移植標本について組織学的解析を行った。その結果、GV

様の構造はヒト同様にSMA陽性細胞が他モデルと比較し厚く血管周囲を覆っていることを見いだした。これら同所移植モデルは十分にヒト膠芽腫病理を反映しているものの、腫瘍生育に3-4週間の時間を要した。

本研究では、siRNA製剤の薬効を病理組織構築と比較をしつつ、十分に検証する必要があった。そこでより迅速な解析を行うために、TS-GFP細胞による皮下移植モデルの組織構築について解析を行った。

並行して、H24年度に確立したヒト膠芽腫に関する既存データベースを用いた*in silico*解析手法により導出した、GV抑制にあたり有力な候補分子の中から、CXCL12およびその受容体であるCXCR4について解析を進めた。

まずCXCR4を阻害する、低分子化合物（AMD3100：既に臨床投与が認可されている）をTS-GFP細胞皮下移植モデルに投与し、PC被覆およびナノ粒子（PICsome）分布に関して組織学的に解析した。

さらに、CXCL12を抑制するsiRNA配列（siCXCL12）を決定した上で、siRNA送達用ナノデバイスであるcRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリシンによるミセルに搭載し（以下、siCXCL12ミセル）、同様にPC被覆並びにPICsome分布を評価した。

（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原則のもと研究を遂行した。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とっている。

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、承認を得て行った。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した。

C．研究結果

はじめに、TS-GFP細胞を移植する際に調製する細胞懸濁液の至適条件について検討を行った。TS-GFP細胞 3×10^5 個を、TS-GFP細胞の培養培地（TS培地）またはTS培地とマトリゲル基底膜マトリックスグロースファクターリデュースト（マトリゲルGFR、コーニング社）を等量ずつ混じた溶液で懸濁し、マウス腹部に移植した。

腫瘍体積の経時変化を追ったところ十分に生着し、移植後10日目には解析を予定していた 500mm^3 に達した。組織学的な評価を行った結果、皮下腫瘍組織内の血管もまた、脳同所移植モデルと同様にSMA陽性細胞による被覆が顕著に見られ、血管密度が高く、形状も不整であった。

この傾向は、特にTS培地とマトリゲルGFRを混じた溶液で細胞懸濁液を調製した群において顕著であった。

この結果より、皮下移植モデルを用いることでより迅速にGV内PC抑制による薬効評価を行うことが可能であると考え、初期検討において皮下移植モデルを利用することとした。また、以後の実験ではTS培地とマトリゲルGFRを等量混じた溶液で移植細胞の懸濁液を調製した。

次に、H24年度に確立した*in silico*解析手法により導出した、GV抑制にあたり有力な候補分子の中から、初めにCXCL12について検証を進めた。

まずTS-GFP細胞皮下移植動物モデルに対し、CXCL12の受容体であるCXCR4の低分子阻害剤（AMD3100）を、移植後7-9日目に 0.25 mg/kg ずつ腹腔内投与し、10日目に腫瘍組織を回収し、PC被覆に関して組織学的に解析を行った。その結果、PC（SMA陽性細胞）による血管の被覆が約50%低下していることを見いだした。

続いて、AMD3100による処置後にCy5標識nano-PICsome（Cy5-PICsome）を尾部静脈より投与した個体に関してPC被覆とCy5-PICsome分布について評価し、粒径が 100 nm であるナノ粒子の腫瘍内分布にAMD3100が与える影響について解析した。

その結果、AMD3100によりCy5-PICsomeの腫瘍内分布領域が有意に拡大することが明らかになった。

そこでさらに、CXCL12を抑制するsiRNA配列 (siCXCL12) を設計した (siCXCL12-CDS1またはCDS2) 。始めにin vitroにおける抑制効率を解析した結果、いずれも70-80%程度CXCL12の発現を抑制可能であることを確認した。

そこで、これらのsiRNAをcRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリシンによるミセルに搭載し(対照ミセルおよびsiCXCL12ミセル) 、同様にPC被覆並びにCy5-PICsome分布を評価した。

始めに、TS-GFP細胞皮下移植モデルに対し移植後3、5、7、9日目に、siCXCL12-CDS1またはCDS2または対照siRNAを各々内包した高分子ミセルをsiRNA濃度9.2 μ Mとなるよう調製された水溶液を200 μ l/匹の投与量で尾静脈より投与し、移植後10日目に腫瘍組織を回収した。PC被覆に関して組織学的に解析を行った結果、siCXCL12-CDS1またはCDS2のいずれを内包したミセルによっても、PC被覆の有意な抑制は観察されなかった。

さらに詳細に血管構築を解析したところ、CXCL12の抑制により血管の形状が対照群とは異なることを見いだした。CXCL12は血管新生亢進にも寄与するという報告もなされていることから、腫瘍形成期間の初期からCXCL12を抑制する今回の治療プロトコルでは、PC被覆を伴う腫瘍血管に対する薬効については解析が難しいと判断した。そこで次に、TS-GFP細胞皮下移植モデルにおける10日間の腫瘍形成期間のうち、腫瘍内血管が十分にPCにより被覆される時期の特定を試みた。TS-GFP細胞移植後3-8日目の期間に関して腫瘍内血管のPC被覆率を評価した結果、移植後6日目以降には血管構築が安定化し、PC被覆も80-90%ほどの血管で豊富に見られることを確認した。

以上より、TS-GFP細胞皮下移植モデルにおいてPC抑制を行うミセル製剤の投与は、移植後6日目以降が適切であると考えた。

そこで、改めてsiCXCL12ミセルのPC被覆に対する影響を評価するために、TS-GFP細胞皮下移植モデルに対し移植後6、8日目にsiCXCL12ミセルまたは対照ミセルを投与後、10日目に腫瘍組織を回収して組織学的に解析を行った。

その結果、PC被覆 (SMA、NG2陽性) 血管の有

意な減少が確認できた。さらに、同様にsiCXCL12ミセルまたは対照ミセルを投与後、さらに9日目にCy5-PICsomeを投与し、10日目に腫瘍組織を回収して組織学的に解析を行った結果、siCXCL12ミセル投与群においてPICsome分布領域が拡大することを確認した。

以上の結果より、TS-GFP細胞による膠芽腫モデルにおいてCXCL12を特異的に抑制するsiRNAミセルを投与すれば、その後に投与するナノ薬剤の腫瘍実質への到達効率を改善することができることが示された。

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の確立を目指した。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ルロイド血管 (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膵癌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。

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細胞の選定に至った。H25年度はこのTS-GFP細胞を用い、GV様構造における壁細胞 (pericyte, PC) を抑制することを試みた。H24年度行ったヒト膠芽腫に関する既存データベースを用いたin silico解析より、標的候補としてCXCL12を得たことを受け、H25年度にはこの発現を抑制するsiRNAやその受容体であるCXCR4阻害剤をTS-GFP細胞移植モデルに投与し、PC被覆率ならびにCXCL12抑制後の腫瘍内に

おけるナノ薬剤の分布について解析を行った。異なる投与スケジュールによる複数の検討の結果、TS-GFP細胞による腫瘍組織内で血管が十分に構築され、PC被覆も豊富になった時期からCXCL12を抑制するミセル製剤を投与すれば、その後投与するナノ薬剤の分布効率を向上させられることが明らかになった。この結果から、膠芽腫においても血管構築を制御することにより100 nm程度の比較的大きな粒径を持つナノ粒子の腫瘍実質への送達効率を改善することが可能であることが示唆された。今回用いた膠芽腫モデルはマウス由来細胞であるため、ヒト臨床検体由来の膠芽腫モデル細胞を用いて同様の検証を行う必要があることは課題であるが、ヒト病理組織の解析から、ヒト膠芽腫のGVにおいても、CXCL12受容体であるCXCR4陽性細胞が観察されることがわかった。CXCR4陽性の患者は予後が悪いことが既存データベースによる解析より明らかになり、一方、これまでの研究より、予後の悪い症例においてGVが多く観察されることも見出している。これらより、ヒト膠芽腫においてもCXCR4のGV形成への関与が示唆され、マウス由来モデル細胞であるTS-GFP細胞で確認されたCXCL12阻害によるナノ粒子分布増大の傾向がヒトにおいても再現可能であることが期待できると考えている。

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、下記の進展があった。

まず、GV構成細胞を抑制するシグナル分子の同定について、本研究ではGV形成の責任因子として主に老化関連分泌因子群（Senescence-associated secretory proteins, SASPs）に着目してきた。H24年度に本研究のモデル細胞として見出したTS-GFP細胞についても、SASPs遺伝子群（特にCXCLs、EGF）が高発現していることを確認し、SASPsがGV抑制

の標的候補であることが改めて示唆された。さらに既存データベースを用いたin silico解析結果を合わせ、CXCL12を標的分子候補として解析を進めた。

薬効の評価基準として壁細胞マーカーであるSMA陽性細胞による血管被覆率を指標とし、TS-GFP細胞移植モデルを用いた解析を行った結果、CXCL12の受容体であるCXCR4の低分子阻害剤を投与することによりより壁細胞被覆が有意に低下することを見出した。

さらに分担研究者により行われた、ヒト膠芽腫CXCL12受容体であるCXCR4のヒト病理における発現解析の結果、GV構造が主に見られるGradeIVの検体においてのみ、GV構造においてCXCR4陽性細胞が確認できた。GradeIVの検体ではGV構造周囲においても、CXCR4陽性細胞がGVに向けて集積する病理像が得られており、CXCL12-CXCR4シグナルがヒト病理においてもGV形成に関与する可能性が示唆された。

また、分担研究者とともに、新たに腫瘍細胞の三次元培養に成功し、その技術基盤を確立した。本法によって多層化した腫瘍細胞の細胞応答性に関して検討した結果、層構造の厚みが増すほど各種壁細胞マーカーの発現上昇が確認された。

次に、分担研究者とともに、実用化可能なsiRNA内包高分子ミセルの開発を行い、H25年度は、siRNA送達用のナノ粒子キャリアとして、企業導出済み実績のあるsiRNA内包高分子ミセルを用いた。具体的には、cRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリンを用いた。このsiRNA内包高分子ミセルは、腫瘍血管内皮細胞に過剰発現するインテグリン受容体の特異的に認識する環状RGDペプチドを表層に搭載したものであり、標的分子発現を抑制する種々のsiRNAについてin vivoにおける奏功が確認されている。我々もCXCL12に対するsiRNAを設計し、同高分子ミセルに内包し（siCXCL12ミセル）、TS-GFP細胞移植モデルに投与した。その結果、siCXCL12投与群において壁細胞が強く抑制され、siCXCL12ミセル処置後に投与されるナノ薬剤の腫瘍内分布が向上することが明らかになった。

さらに、siCXCL12の投与スケジュールに関し検討した結果、わずか一回の投与でもナノ薬剤分布改善の効果がみられることを確認した。これらの結果から、siCXCL12をナノ担体に内包して腫瘍血管を特異的に抑制し、さらにナノ薬剤を投与すれば、膠芽腫においても十分なナノDDSを達成しう

ることが示唆された。

本研究で得たこれらの成果に基づき、その産業化を促進するため、関連企業と共同研究を開始した。

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

Kano MR. Nanotechnology and tumor microcirculation. Adv Drug Deliv Rev. 2013. Epub ahead of print.

Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Cyclic RGD-Linked Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Platinum Anticancer Drugs to Glioblastoma through the Blood-Brain Tumor Barrier. ACS Nano. 2013, in press.

Kokuryo D, Anraku Y, Kishimura A, Tanaka S, Kano MR, Kershaw J, Nishiyama N, Saga T, Aoki

I, Kataoka K. SPI0-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPI0-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsome s). J Control Release. 2013;169(3):220-7.

2. 学会発表

〔学会発表〕

Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases, Kano MR, The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '13)、大阪、口頭発表（招待）、2013.7.

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない

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およびPICmicelle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（PICsome）およびミセル（PICmicelle）によりナノサイズを持つ粒子を構築してきた。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た。

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/micelleにsiRNAを封入することができることを示した（siRNAsome/micelle）。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

昨年度評価を行ったsiRNAsomeと並行して、今年度は腫瘍血管内皮細胞に過剰発現するインテグリン

受容体を特異的に認識する環状RGDペプチドを表層に搭載したsiRNAmicelleを調製し、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

siRNAsomeは動的光散乱法（DLS）にて110nmの粒径であったが、siRNAmicelleは、DLS測定より直径が約50nmかつ分布の狭い（多分散指数0.1以下）ナノ粒子形成が確認された。また、10%FBS中でのsiRNAmicelleの安定性を蛍光相関分光法により評価したところ、カチオマー部位への疎水性官能基の導

入により、その安定性が大幅に改善されることが明らかになった。

次いで皮下移植肺がん(A549)モデルおよび蛍光標識siRNAmicelleを用いてsiRNAの腫瘍集積性を評価したところ、環状RGDペプチドの導入による腫瘍集積性の有意な向上が認められた。そこで、がん細胞のアポトーシスを誘導するpolo-like kinase 1 (PLK1)-siRNAをmicelleに封入し、がん治療実験を行ったところ、腫瘍組織でのPLK1 mRNAの減少および抗腫瘍効果を得ることに成功した(H.-J. Kim et al, *Drug Deliv Transl Res*, 4, 50-60 (2014); H.-J. Kim et al, *Biomaterials*, 35, 4548-4556 (2014))。

D . 考察

siRNAsome, siRNAmicelleともに、ツールとしての有効性が示唆されたと考えられる。特にsiRNAmicelleは動物における遺伝子抑制効果も確認された。

他方で、本研究期間中に動物実験においても有効性のある結果に到達すべき観点から、脳腫瘍動物モデルにおいては、すでに企業導出済みの技術である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)) にCXCL12に対するsiRNAを搭載して用いる検討を並行して行い、有望な結果を得た。(詳細は総括研究報告書を参照。)

E . 結論

siRNAsome、siRNAmicelleともに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。将来的な核酸医薬の候補として極めて有望である。今回研究の成果の実用化にあたり、より効果の強い担体やより動態が改善された担体が必要とされてきた際に、有益な候補となると考えられる。

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

Kim HJ, Miyata K, Nomoto T, Zheng M, Kim A, Liu X, Cabral H, Christie RJ, Nishiyama N, Kataoka K. siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials*. 2014;35(15):4548-56.

2. 学会発表

1. 宮田完二郎, R. J. Christie, H. -J. Kim, 大江祐輔, 西山伸宏, 片岡一則、環状RGDペプチドリガンドを装着した高分子ミセル型siRNAキャリアの開発とがん治療への展開、一般口頭、第29回日本DDS学会学術集会、2013.7.5、京都テルサ、京都市、京都府

2. 宮田完二郎, R. J. Christie、西山伸宏、片岡一則、高分子ナノ材料による核酸デリバリーシステムの開発とがん治療への展開、招待講演、第72回日本癌学会学術総会、2013.10.4、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県

3. 大江祐輔, R. J. Christie、福島重人、西山伸宏、宮田完二郎、片岡一則、コレステロール修飾siRNAを内包したジスルフィド架橋PICミセルの創製と機能評価、一般口頭、第35回日本バイオマテリアル学会大会、2013.11.26、タワーホール船堀、江戸川、東京

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。

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

生体外モデルの構築

研究分担者 松崎 典弥 大阪大学 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った。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) を改善最適化しつつ、GV構築の生体外における再現を目指した。H25年度は、腫瘍細胞を組織化することを考え、多層化を試みた。検討の結果、腫瘍細胞の多層化条件を確立することに成功した。

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った。

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。昨年度までに、分化誘導を行った壁細胞前駆細胞に関して多層化三次元培養が可能であることを明らかにし、三次元培養の条件を確立した。そこで本年度は、膠芽腫細胞そのものの三次元培養を試み、最終的に膠芽腫細胞、壁細胞、内皮細胞すべてを含んだ三次元培養系の開発に向

け技術基盤を確立することを目指した。

B . 研究方法

まず、腫瘍細胞の細胞集積法 (Nishiguchi et al, Adv. Mater., 2011) による三次元培養を試みた。当初、腫瘍細胞は細胞集積法の基本プロトコルによっては十分な培養維持が不可能であった。そこで、腫瘍細胞の三次元培養を行う条件の最適化を試みた。

細胞集積法においては、collagen type IV、laminin、fibronectin、gelatinいずれかによりコーティングを施したカルチャーインサートに、細胞表面にECMナノ薄膜を形成した細胞を播種する。これらの工程におけるECMの詳細条件や、その他の各種培養条件について詳細な検討を行った。

これらの三次元培養細胞は4% PFAで固定処理後パラフィン包埋ブロックを作成し、3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、3次元培養組織の観察を行った。

最後に腫瘍細胞の三次元培養について各種mRNA発現の解析を行い、グロメルロイド血管形成の妥当性について解析した。

C . 研究結果

腫瘍細胞の三次元培養を行う条件について、培地やバッファー、播種細胞数などのパラメーターの最適化を行った。結果として、多層化した状態で長期間培養維持することが可能な培養法を確立することに成功した。

今年度確立した腫瘍細胞の細胞集積法により多層化を行った細胞群の三次元培養にHE染色を施して観察した結果、多層化が確認された。また、播種細胞数が多いほど多くの層形成が達成されることも確認した。

このように多層化を行った腫瘍細胞の細胞応答性に関して確認したところ、層構造の厚みを増すほど壁細胞マーカーの発現が約3-5倍上昇した。さらに、ヒト膠芽腫において高発現が知られるTGFβ2によりSMAの発現が顕著に上昇することも見出した。

これらにより、本研究の目的を達成した。

D . 考察

我々はこれまで、細胞集積法 (Nishiguchi et al, Adv. Mater., 2011) により線維芽細胞など多くの細胞の多層化に成功してきたが、これらと同じ培養プロトコルによっては腫瘍細胞の三次元培養を維持することが困難であったため、腫瘍細胞に適するように細胞集積法の最適化を試みた。

このH25年度に行った検討の結果、我々は新たに腫瘍細胞による三次元培養の技術的基盤を構築できたと考えている。

また、本法によって多層化した腫瘍細胞の細胞応答性に関して検討した結果、層構造の厚みが増すほど各種の壁細胞マーカーの発現上昇を確認した。

さらにTGFβ2によりSMAの発現が顕著に上昇することも見出している。TGFβは壁細胞の分化を促進するシグナル分子であることが知られており、最近になり、ヒト膠芽腫細胞が壁細胞への分化能を有することが報告されているが、今のところGV周囲の細胞が膠芽腫細胞由来であるかどうか十分な検証はされていない。

これらの知見も踏まえ、H25年度の検討結果から、我々は膠芽腫細胞自体がGV構造の骨格をなす重要な構成要素であると考えている。

E . 結論

H25年度の検討の結果、腫瘍細胞を安定的に三次元培養法で維持する手法を確立した。今後、よりヒト病理をよく再現するGV生体外モデルの完成を目指す。

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

1. M. Matsusaki and M. Akashi, Control of Extracellular Microenvironments Using Polymer/Protein Nanofilms for Development of Three-dimensional Human Tissue Chips, Polymer J., accepted (Invited Focus Review, February 17, 2014).

2. A. Nishiguchi, M. Matsusaki, Y. Asano, H. Shimoda, M. Akashi, Effects of Angiogenic Factors and 3D-Microenvironments on Vascularization within Sandwich Culture, Biomaterials 35, 4739-4748 (2014).

3. Y. Asano, A. Nishiguchi, D. Okano, T. Fujita, E. Saito, M. Matsusaki, M. Akashi, H. Shimoda, Ultrastructure of Blood and Lymphatic Vascular Networks in Three-dimensional Cultured Tissues Fabricated by ECM nanofilm-based Cell Accumulation Technique, Microscopy, accepted (January 21, 2014).

4. M. Matsusaki, C. P. Case, M. Akashi, Three-dimensional Cell Culture Technique and Pathophysiology, Adv. Drug Deliv. Rev., accepted (January 15, 2014).

1. 松崎典弥, 明石 満, 生体高分子薄膜による細胞表面の機能制御と三次元組織体の構築, 表面, 広信社, 51(4), 159-169 (2014).

2. 松崎典弥, 明石 満, 生体高分子薄膜を用いた細胞表面の修飾による三次元組織体の構築, 化学と教育, 62(2), 64-67 (2014).

2. 学会発表

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. 【招待講演】M. Matsusaki, M. Akashi, “Control of Cell Surface Microenvironments by LbL Nanofilms for development of 3D-Human Tissue Models”, *NanoKorea2013*, Korea, July 10, 2013.

2. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、“高分子化学に基づく細胞操作と三次元生体組織モデルの創製”、第80回高分子若手研究会 [関西]、関西セミナーハウス、2013年7月27日

3. 【招待講演】M. Matsusaki, M. Akashi, “3D-Vascularized Human Tissue Models Constructed by Cell Surface Control Using Nano-Meter Sized ECM Films”, 4th Synthetic Immunology Workshop “Engineering in Immunity”, Kyoto, November 14, 2013.

4. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、“積み木の化学 - 細胞の集合・組織化の制御と人工組織体の構築”、平成25年度九州地区高分子若手研究会・冬の講演会、ブルーウェーブイン鹿児島、2013年12月1

2日

5. 【基調講演】松崎典弥、明石 満、“化学的細胞操作と細胞プリンティングによる三次元生体組織チップの創製”、日本金属学会2014年春期大会、東工大、2014年3月22日

6. M. Matsusaki, T. Yoshikai, A. Matsuzawa, M. Akashi, “Protection and Functionalization of Cell Surfaces Using Nano-Barrier Films”, *SFB2014 Annual Meeting*, Boston, 2013年4月10日

7. 松崎典弥、明石 満、“ナノおよびマイクロ薄膜コーティングによる細胞の三次元組織化制御の創製”、第62回高分子討論会、金沢大学、2013年9月12日

8. 松崎典弥、明石 満、“ナノ薄膜コーティングによる細胞膜表面の機能制御と三次元ヒト組織モデルの創製”、サントリー生命科学財団生有研セミナー、サントリー研究センター、2013年8月21日

9. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、“化学的細胞操作に基づく三次元生体組織構築”、日本化学会関東支部講演会「再生医療と化学」、化学会館、2013年9月18日

10. M. Matsusaki, M. Akashi, “3D-Human Tissue Chips Fabricated by Rapid and Automatic Inkjet Cell Printing for Drug Assessments”, 12th US-Japan Symposium on DDS, Hawaii, 2013年12月16日

11. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、“動物実験の代替を目指した工学的な三次元組織構築”、日本動物実験代替法学会第26回大会、京都テルサ、2013年12月20日

12. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、“工学的細胞操作による創薬研究のための三次元ヒト生体組織体の構築”、第13回日本再生医療学会総会シンポジウム、国立京都国際会館、2014年3月4日

13. 松崎典弥、明石 満、“細胞積層・集積法で構築した三次元生体組織の創薬分野への応用”、武田薬品工業基盤技術研究所講演会、武田薬品工業湘南

研究所、2014年3月5日

14. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、“血管・リンパ管網を持つ組織の構築：バイオマテリアルによる取り組み”、第13回日本再生医療学会総会シンポジウム、国立京都国際会館、2014年3月6日

15. 松崎典弥、明石 満、“細胞集積法により構築した灌流可能な三次元ヒト毛細血管組織による生体外での物質透過性評価”、日本化学会第94春季年会、名古屋大学、2014年3月26日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 出願番号：特願2013-245261

発明者：明石 満・松崎典弥

発明の名称：三次元組織体及びその製造方法

出願人：国立大学法人大阪大学

出願日：2013年11月27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。

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た。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った。

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パラフィン包埋病理標本について、CD31, CD34といった血管内皮細胞を認識する分子マーカーおよびCXCL12受容体であるCXCR4について染色し解析した。

（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

定が行われないよう最大限の配慮をなした。

C . 研究結果

GV構造は、GradeIIIの脳腫瘍では殆ど観察されず、GBMで特徴的に出現する病理構造であることが知られている。

そこでWHO分類GradeIIIである退形成性星細胞腫(AA)2症例と、同分類GradeIVである膠芽腫(GBM)3症例についてCXCR4の染色を行った。

その結果、GBMの検体においてのみ、GV構造においてCXCR4陽性細胞が認められた。GV構造周囲においては、CXCR4陽性細胞がGVに向けて集積する病理像が得られた。

D . 考察

これまで行った研究におけるヒト病理解析の情報から、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。我々はさらに予後の悪い症例においてGVが多く観察されることを見出した。

今回の解析から、ヒト膠芽腫GVにおいてCXCR4陽性細胞が認められ、CXCL12-CXCR4シグナルがヒト病理においてもGV形成に關与する可能性が示唆された。

GV形成過程においてCXCR4陽性膠芽腫細胞が血管内皮細胞周囲に集積して多層化し、その結果として壁細胞に分化する可能性も考えられる。今後は、種々のヒト膠芽腫モデル細胞を用いての重ねての検討が必要ではあるが、今回行ったヒト病理解析の結果からもCXCL12-CXCR4シグナルの標的分子としての有望性が支持されると考えている。

E . 結論

本研究によるヒト病理標本の解析により、ヒト膠芽腫におけるGV構造においてCXCR4陽性細胞が確認され、ヒトにおいてもCXCL12-CXCR4シグナルの抑制によりGVを制御しうる可能性が示唆された。

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

Nishihara H. Human pathological basis of blood vessels and stromal tissue for nanotechnology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Epub ahead of print.

Miyazaki M, Nishihara H, Terasaka S, Kobayashi H, Yamaguchi S, Ito T, Kamoshima Y, Fujimoto S, Kaneko S, Katoh M, Ishii N, Mohri H, Tanino M, Kimura T, Tanaka S. Immunohistochemical evaluation of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression in 117 cases of glioblastoma. *Neuropathology.* 2014, Epub ahead of print.

Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano.* 2013, 22;7(10):8583-92.

Kanno H, Nishihara H, Wang L, Yuzawa S, Kobayashi H, Tsuda M, Kimura T, Tanino M, Terasaka S, Tanaka S. Expression of CD163 prevents apoptosis through the production of granulocyte colony-stimulating factor in meningioma. *Neuro Oncol.* 2013;15(7):853-64.

Kato Y, Nishihara H, Mohri H, Kanno H, Kobayashi H, Kimura T, Tanino M, Terasaka S, Tanaka S. Clinicopathological evaluation of cyclooxygenase-2 expression in meningioma: immunohistochemical analysis of 76 cases of low and high-grade meningioma. *Brain Tumor Pathol.* 2014;31(1):23-30.

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kano, MR	Nanotechnology and tumor microcirculation.	Adv Drug Deliv Rev.	掲載確定	掲載確定	2013
Nishihara, H	Human pathological basis of blood vessels and stromal tissue for nanotechnology.	Adv Drug Deliv Rev.	掲載確定	掲載確定	2013
S. Shinohara, T. Kihara, S. Saito, M. Matsuda, 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.	掲載確定	掲載確定	2013

書籍：該当なし