

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390379
 研究課題名（和文） 中心体過剰複製・染色体不安定性の誘導による悪性グリオーマの放射線増感機序の解明
 研究課題名（英文） Effect of centrosome amplification / chromosome instability on the radiosensitivity in human glioma cells
 研究代表者 栗栖 薫（KURISU KAORU）
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：70201473

研究成果の概要（和文）：ヒト悪性グリオーマ培養細胞を使い、染色体不安定性（中心体過剰複製）と Survivin が放射線感受性に及ぼす影響を調べた。p53 変異 U251MG 細胞は Survivin の発現を抑制すると速やかに中心体が過剰複製されて放射線感受性が高まるが、p53 野生型 D54MG 培養細胞は、Survivin の発現抑制後しばらくして中心体過剰複製が始まって放射線感受性が高まった。いずれの細胞もアポトーシスでは無い分裂期崩壊による細胞死が引き起こされた。臨床面でも、Survivin の細胞内局在が悪性グリオーマの治療予後に関与することを示し、染色体不安定性や Survivin は、グリオーマ治療の重要な因子と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We examined the effect of survivin suppression on radiosensitivity in malignant glioma cells, focusing on centrosome aberration and chromosome instability (CIN), showing that the radiosensitisation differed regarding the p53 status as U251MG human glioma cells (p53 mutant type) quickly developed extreme centrosome amplification and enhanced the radiosensitivity, while centrosome amplification and radiosensitivity increased more gradually in D54MG human glioma cells (p53 wild type). This cell death was suggesting mitotic (not apoptotic) cell death. We examined immunohistochemically the relationship between prognosis and subcellular localization of survivin in high-grade astrocytoma, showing that simultaneous expression of survivin in both the nucleus and cytoplasm predicts poor prognosis of patients with high-grade astrocytoma. Therefore, paying proper attention to the degree of CIN and survivin expression may thus be of crucial importance in improving radiation therapy for the treatment of human glioma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 8,600,000 | 2,580,000 | 11,180,000 |
| 2008年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 2009年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性グリオーマ、中心体、放射線感受性

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは予後不良であり、手術後に放射線・化学療法を追加しても、満足いく治療成績を得ることは出来ない。悪性グリオーマ細胞は、放射線感受性が低く、それが原因で治療効果が低いことが示唆された。我々の研究室では、Survivin を抑制された腫瘍細胞は、その染色体が不安定となり、中心体が異常に過剰複製し、放射線感受性が高まる可能性について研究を続けてきた。分裂期キナーゼの過剰発現、スピンドルチェックポイント調節因子、DNA 修復機構調節因子を阻害しても染色体が不安定になる、との報告もなされ、染色体不安定性が放射線感受性に深く関わっていることが示唆されるものの、本研究開始当初において、中心体の過剰複製（染色体不安定性）と放射線感受性について、明らかにした報告は認められない。

2. 研究の目的

従来、染色体不安定性は腫瘍細胞の悪性度を反映する、という概念が主流であり、放射線感受性との関連性について、あまり論じられることが無かった。そこで、我々は、染色体不安定性を反映する中心体の過剰複製を起こした細胞の放射線感受性は高まることを証明し、その他の因子についても解析を進め、中心体過剰複製・染色体不安定性を誘導することが、放射線感受性を高めることにつながるという、新しい概念を打ち立てることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNAi 法を用いて悪性グリオーマ培養細胞内の Survivin の発現を抑制し、中心体の蛍光染色と FISH 法によって染色体の不安定性を解析。放射線感受性はコロニー法で解析。染色体不安定性と放射線感受性との関連性を調べた。

(2) 悪性グリオーマ培養細胞の p53 変異型と p53 野生型で (1) の結果を比較検討。更に、アポトーシスの発現についても検討。

(3) 臨床検体を用い、悪性グリオーマの手術・放射線・化学療法後の予後を左右する因子として、Survivin、Geminin、RB、P27、PEA-15 などに注目して検討した。

(4) 同じ悪性グリオーマ細胞でも、一部に含まれる stem cell like cell は、その他の細胞に比べて、放射線感受性が低いことが報告されている。そこで、悪性グリオーマ培養細胞の stem like cell の分離・培養を試みた（無血清培地で培養して sphere を形成した細胞群を単離）。そして、Survivin の発現

を調べた。

(5) 神経幹細胞の培養に有用とされる無重力の技術が、悪性グリオーマ培養細胞に及ぼす影響についても検討を行った。

4. 研究成果

RNAi 法を用いて悪性グリオーマ培養細胞内の Survivin の発現を抑制させて、染色体不安定性（中心体の数と FISH 法で評価）と放射線感受性を解析した (Fig.1, Fig.2)。

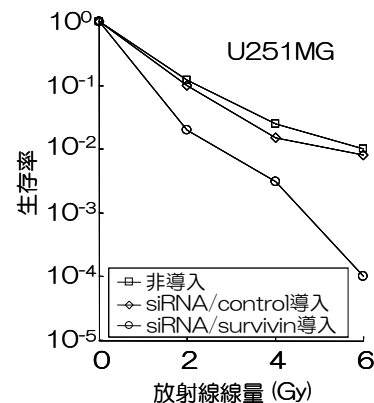
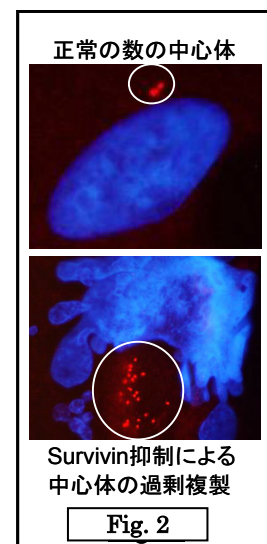


Fig. 1: Survivin 抑制による悪性グリオーマ細胞の放射線増感効果

すると、p53 が変異したヒトグリオーマ培養細胞 (U251MG) では、Survivin の発現を抑制すると、速やかに中心体が過剰複製され、初期より放射線感受性が高まった。しかし、p53 が野生型のヒトグリオーマ培養細胞 (D54MG) は、Survivin の発現を抑制してしばらくしてから中心体は過剰複製が始まり、放射線感受性も



U251MG 細胞よりも遅れて高まった。TUNEL 法による解析から、この間に引き起こされた放射線細胞死はアポトーシスでは無く、細胞周期の解析による異数倍体の状態の結果から、直接細胞死が誘導されていることが考えられ、分裂期崩壊による細胞死であることが示唆された。このことから、通常、染色体不安定性は組織学的に悪性度を反映すると考えられてきたが、過剰に染色体不安定性が引き起こされると、その程度に応じて放射線感受

性は高まり、結果として治療効果が高まる可能性が示唆された。

悪性グリオーマ細胞の放射線感受性に Stem like cell が強く関与していることが示唆されていることから、本年度は悪性グリオーマ細胞株から Stem like cell を樹立し、放射線感受性への影響を Survivin 発現を中心に検討した。まず各種悪性グリオーマ培養細胞を無血清培地で培養し、sphere を形成することを確認した。U251MG 細胞で形成された Sphere に関して抗 CD133 抗体 (腫瘍幹細胞に比較的特異的とされる抗体)、抗 Survivin 抗体で蛍光免疫染色を行い、Sphere 形成細胞群では、Sphere を形成していない接着細胞群と比較して、CD133 陽性細胞の割合が高く、Survivin の染色性も強い傾向が認められた。更に、他の悪性グリオーマ培養細胞についても Stem like cell の樹立が可能かどうかについての検討も行い、U251 細胞以外にも Sphere を形成させることに成功し、幾代かの継代も成功している。今後、腫瘍幹細胞の放射線感受性や細胞分裂、染色体不安定性への影響について検討する予定である。また、神経幹細胞の培養に有用とされる無重力の技術が、悪性グリオーマ培養細胞に及ぼす影響についても検討を行い、無重力環境下では細胞は増殖が抑制され、化学療法に対する感受性が高まることが示唆された。今後は、この技術を応用し、Stem like cell の研究を進展させることを予定している。

悪性グリオーマ患者の手術・放射線・化学療法の効果に Survivin 発現が及ぼす影響について、臨床検体を用い、Survivin の細胞内局在を免疫組織学的に評価し、予後との関連性を調べてみた。すると、核内と細胞質内の双方に Survivin が発現すると、予後が不良であった。Survivin 発現の細胞内局在が治療後の予後を左右することも明らかにした。このことは、Survivin 発現が放射線感受性に影響を及ぼしている可能性があることを、臨床面でも明らかにしたものと考えられる。(Fig. 3)

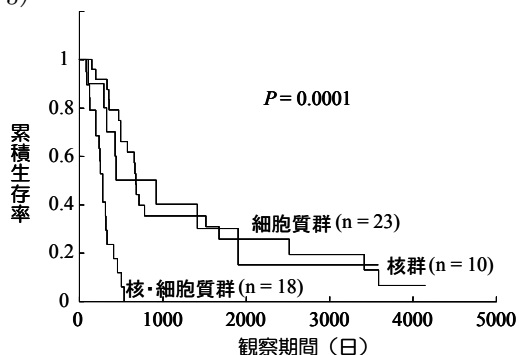


Fig. 3 悪性グリオーマにおける Survivin 発現の局在と生存期間

更に、悪性グリオーマの手術・放射線・化学療法後の予後を左右する Survivin 以外の因子に関する研究も同時に行い、Geminin、p16、P27、PEA-15 などの関与も新たに明らかにした。これらの知見は、今後の悪性グリオーマの放射線感受性に関わる機序の解明に向けた研究の素地になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Saito T, Yamasaki F, Kajiwara Y, Abe N; Akiyama Y, Kakuda T, Takeshima Y, Sugiyama K, Kurisu K, Okada Y. Role of perfusion-weighted imaging at 3 Tesla in the histopathological differentiation between astrocytic and oligodendroglial tumors. *European Journal of Radiology*. 2011, in press. (査読あり)
- ② Yamasaki F, Sugiyama K, Ohtaki M, Takeshima Y, Abe N, Akiyama Y, Takaba J, Amatya VJ, Saito T, Kajiwara Y, Hanaya R, Kurisu K. Glioblastoma treated with postoperative radio-chemotherapy: prognostic value of apparent diffusion coefficient at MR imaging. *Eur J Radiol*. 2010 Mar;73(3):532-7. Epub 2009 Feb 27. (査読あり)
- ③ Watanabe Y, Yamasaki F, Kajiwara Y, Saito T, Nishimoto T, Bartholomeusz C, Ueno NT, Sugiyama K, Kurisu K. Expression of phosphoprotein enriched in astrocytes 15 kDa (PEA-15) in astrocytic tumors: a novel approach of correlating malignancy grade and prognosis. *J Neurooncol*. 2010 Dec;100(3):449-57. (査読あり)
- ④ Takeda M, Magaki T, Okazaki T, Kawahara Y, Manabe T, Yuge L, Kurisu K. Effects of simulated microgravity on proliferation and chemosensitivity in malignant glioma cells. *Neurosci Lett*. 2009 Sep 29;463(1):54-9. (査読あり)
- ⑤ Hidaka T, Hama S, Shrestha P, Saito T, Kajiwara Y, Yamasaki F, Sugiyama K, Kurisu K. The combination of low cytoplasmic and high nuclear expression of p27 predicts a better prognosis in high-grade astrocytoma. *Anticancer Res*. 2009 Feb;29(2):597-603. (査読あり)

- ⑥ Doskaliyev A, Yamasaki F, Kenjo M, Shrestha P, Saito T, Hanaya R, Sugiyama K, Kurisu K. Secondary anaplastic oligodendroglioma after cranial irradiation: a case report. *J Neurooncol.* 2008 Jul;88(3):299-303. Epub 2008 Mar 29. (査読あり)
- ⑦ Saito T, Sugiyama K, Yamasaki F, Tominaga A, Kurisu K, Takeshima Y, Hirose T. Familial occurrence of dysembryoplastic neuroepithelial tumor-like neoplasm of the septum pellucidum: case report. *Neurosurgery.* 2008 Aug;63(2):E370-2; discussion E372. (査読あり)
- ⑧ Saito T, Hama S, Izumi H, Yamasaki F, Kajiwara Y, Matsuura S, Morishima K, Hidaka T, Shrestha P, Sugiyama K, Kurisu K. Centrosome amplification induced by survivin suppression enhances both chromosome instability and radiosensitivity in glioma cells. *Br J Cancer.* 2008 Jan 29;98(2):345-55. Epub 2008 Jan 15. (査読あり)
- ⑨ Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K. Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. *J Neurooncol.* 2007 Apr;82(2):193-8. (査読あり)
- ⑩ Shrestha P, Saito T, Hama S, Arifin MT, Kajiwara Y, Yamasaki F, Hidaka T, Sugiyama K, Kurisu K. Geminin: a good prognostic factor in high-grade astrocytic brain tumors. *Cancer.* 2007 Mar 1;109(5):949-56. (査読あり)
- ⑪ Yamasaki F, Kajiwara Y, Hama S, Murakami T, Hidaka T, Saito T, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K. Retinoblastoma protein prevents staurosporine-induced cell death in a retinoblastoma-defective human glioma cell line. *Pathobiology.* 2007;74(1):22-31. (査読あり)

[学会発表] (計 18 件)

招待講演

- ① Kaoru Kurisu 。 Survivin - its importance and property on the biological aspects of glioma -。 The World Federation of Neurosurgical Societies Meeting 2009 (招待講演)。 2009年9月4日発表。 Boston (USA)。

学会発表

- ① 渡邊陽祐、栗栖薫、他。グリオーマにおける MR spectroscopy による myo-inositol 測定の臨床的意義の検討。日本脳神経外科学会 第 69 回学術総会。2010年10月28日発表。福岡。
- ② 渡邊陽祐、栗栖薫、他。星細胞腫における PEA15 (Phosphoprotein Enriched in Astrocytes) 発現の検討。第 27 回日本脳腫瘍学会。2009年11月8日発表。大阪。
- ③ 渡邊陽祐、栗栖薫、他。再発膠芽腫に対する治療法に関する検討。第 26 回日本脳腫瘍学会。2008年12月1日発表。松山。
- ④ 渡邊陽祐、栗栖薫、他。再発膠芽腫に対する治療法に関する検討。第 67 回日本脳神経外科学会総会。2008年10月1日発表。盛岡。
- ⑤ 日高敏和、栗栖薫、他。若年性びまん性橋神経膠腫の検討。第 67 回日本脳神経外科学会総会。2008年10月1日発表。盛岡。
- ⑥ 梶原佳則、栗栖薫、他。Gliomatosis Cerebri 11 例の検討。第 67 回日本脳神経外科学会総会。2008年10月1日発表。盛岡。
- ⑦ 日高敏和、栗栖薫、他。高悪性度星状細胞腫において p27 の細胞質内発現低下と核内発現上昇の組み合わせは良好な予後を予測させる。第 26 回日本脳腫瘍病理学会。2008年5月23日発表。東京。
- ⑧ 齋藤太一、栗栖薫、他。神経線維腫症 1 型に合併した giant cell glioblastoma の一例。第 26 回日本脳腫瘍病理学会。2008年5月23日発表。東京。
- ⑨ 齋藤太一、栗栖薫、他。Survivin 抑制による中心体過剰複製は glioma の染色体不安定性と放射線感受性を上げる。第 25 回日本脳腫瘍学会。2007年12月9日発表。東京。
- ⑩ 山崎文之、栗栖薫、他。精巣関連遺伝子 MORC1 は分裂期 checkpoint 機能障害を引き起こし、paclitaxel 耐性とする。第 25 回日本脳腫瘍学会。2007年12月9日発表。東京。
- ⑪ 日高敏和、栗栖薫、他。悪性グリオーマにおける p27 の Subcellular localization の検討。第 25 回日本脳腫瘍学会。2007年12月9日発表。東京。
- ⑫ 日高敏和、栗栖薫、他。悪性グリオーマにおける p27 の Subcellular localization の検討。第 66 回日本脳神経外科学会総会。2007年10月4日発表。東京。
- ⑬ 齋藤太一、栗栖薫、他。Survivin 抑制による悪性グリオーマ細胞の放射線感受性機序の検討—中心体過剰複製と染色

体不安定性の検討。第66回日本脳神経外科学会総会。2007年10月4日発表。東京。

- ⑭ Shrestha Prabin、栗栖薫、他。ジェミニン：悪性グリオーマにおける予後良好因子。第66回日本脳神経外科学会総会。2007年10月4日発表。東京。
- ⑮ 齋藤太一、栗栖薫、他。小脳 glioblastoma の免疫組織化学的所見と予後との関連についての検討：テント上 glioblastoma との比較検討。第25回日本脳腫瘍病理学会。2007年4月19日発表。熊本。
- ⑯ Shrestha Prabin、栗栖薫、他。Geminin: a good prognostic factor in high-grade astrocytic brain tumors. 第25回日本脳腫瘍病理学会。2007年4月19日発表。熊本。
- ⑰ Aidos Doskaliyev、栗栖薫、他。Secondary anaplastic oligo-astrocytoma after cranial irradiation - A case report. 第25回日本脳腫瘍病理学会。2007年4月19日発表。熊本。

[その他]

ホームページ等：

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/nouge/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗栖 薫 (KURISU KAORU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70201473

(2) 研究分担者

杉山 一彦 (SUGIYAMA KAZUHIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30243554

研究分担者

濱 聖司 (HAMA SEIJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究員

研究者番号：40397980

研究分担者

松浦 伸也 (MATSUURA SHINYA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：90274133

研究分担者

泉 秀樹 (IZUMI HIDEKI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：10397987

(H19→H20)

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：