

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19956

研究課題名(和文) Notch, Aktシグナル阻害によるグリオーマ幹細胞の完全制御

研究課題名(英文) Complete regulation of glioma stem cell by notch and Akt signal inhibition

研究代表者

田中 慎吾 (tanaka, shingo)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：40507084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は予後不良な悪性腫瘍であり、膠芽腫幹細胞に対する治療が再発予防や根治性の向上に重要とされている。我々は、Notch阻害薬はAktシグナル抑制によって膠芽腫幹細胞へ効果を示すことと高感受性群と低感受性群に分けられることを報告した。本研究では、Notch阻害剤低感受性膠芽腫幹細胞群に対しNotch阻害剤とAkt阻害剤の併用療法の有効性を評価した。2剤併用療法は単剤よりも有意に細胞増殖抑制、幹細胞形質維持の抑制、アポトーシス誘導の増強を認めた。したがってNotch阻害薬にAkt阻害薬を併用することによりNotch阻害剤低感受性膠芽腫幹細胞を制御できることは示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is the most malignant primary brain tumor in humans. The patients with glioblastoma have a uniformly poor prognosis. The significance of targeting glioblastoma-stem cells may be important for successful treatment. In this study, we analyzed the efficacy of the Notch inhibitor and Akt inhibitor for glioblastoma stem cell with Notch inhibitor resistance. Notch inhibitor concomitant Akt inhibitor treatment enhanced the effect by monotherapy such as suppression of cell proliferation and stemness maintenance, and promotion of apoptosis.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：Notch阻害薬 Akt阻害薬 膠芽腫

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性かつ制御困難な腫瘍である。腫瘍摘出術に加え放射線化学療法を施行しても生存期間は2年未満のことが多い。昨今の医療進歩による他臓器癌治療成績の改善を鑑みると、過去30年にわたり治療成績がほぼ不変である膠芽腫に対して新たな治療法の確立は最重要課題である。膠芽腫は正常脳組織へ浸潤して増大していく特徴があるため他臓器固形癌と異なり外科的完全切除は不可能である。そのため外科的切除後の残存腫瘍制御のために新たな化学療法の確立が必須である。

近年のがん基礎研究では腫瘍の起源となる癌幹細胞の存在が提唱され、脳腫瘍においてもグリオーマ幹細胞がいち早く同定され、研究領域が急速に拡大している。

我々は以前、9種類の膠芽腫患者由来の腫瘍幹細胞を用いてがん幹細胞の形質維持、細胞増殖、アポトーシス制御を担っているNotchシグナルの阻害効果を解析し、グリオーマ幹細胞はNotch阻害剤(MRK003)に対して高感受性株と低感受性株に分けられることを見出した。さらにMRK003高感受性細胞はAktシグナルが高度に阻害され、MRK003低感受性細胞はAktシグナルが維持されることを示した(*J Neurooncol* 2014)。Aktシグナルは、細胞増殖、アポトーシス制御等に関連するシグナルであり、他臓器固形癌だけでなくグリオーマにおいて最も重要なシグナルの1つとされる。

Akt阻害剤であるMK2206は選択的にAktシグナルを阻害する経口投与可能な化合物であり、基礎研究において肝細胞癌、乳癌、肺癌などに対しMK2206を他の抗癌剤に併用することで細胞増殖抑制、アポトーシスが增强されることが報告され、臨床試験へ応用されている。グリオーマに関しては、膠芽腫細胞株でMRK003とMK2206の併用にて浸潤能抑制効果が增强したとする報告があるのみであり、グリオーマ幹細胞に対するMRK003とMK2206の併用効果の解析はまったくなされていない。グリオーマ幹細胞に対するNotch阻害剤の解析の中でNotch阻害剤抵抗性グリオーマ幹細胞のAktシグナルが保持されることに着目し、Notch阻害剤とAkt阻害剤の併用によるグリオーマ幹細胞制御を試みる本プロジェクトを立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MRK003低感受性グリオーマ幹細胞を用いてMRK003とAkt阻害剤(MK2206)の併用療法の有効性を評価し膠芽腫に対する分子標的薬剤2剤の併用による新たな分子標的療法の基礎基盤を構築することにある。

3. 研究の方法

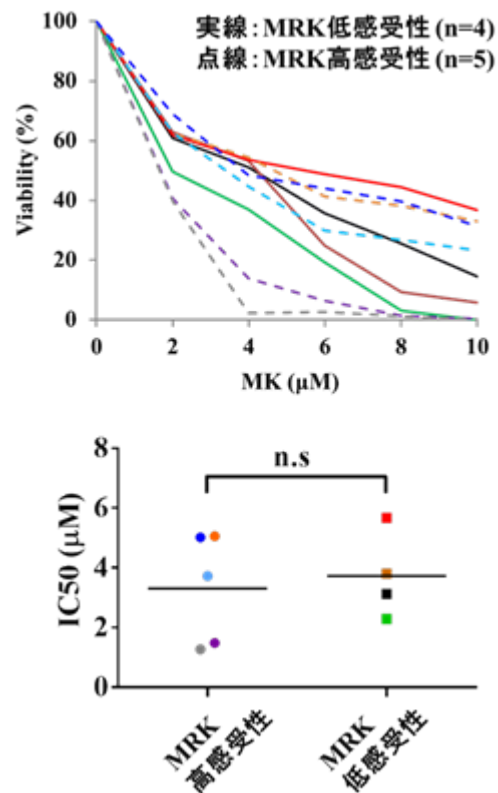
本研究で使用する膠芽腫幹細胞は、膠芽腫患者由来であり、幹細胞形質が既に確認されている膠芽腫幹細胞である。MRK003高感受性群と低感受性群でMK2206単剤の効果を比較した。次にMRK003に低感受性であった4種類のグリオーマ幹細胞株を用いて、MK2206によるAktシグナルの変化を蛋白レベルで解析した。MRK003低感受性群に対するMRK003とMK2206併用療法による細胞増殖能、sphere形成能およびアポトーシスへの影響を評価した。

4. 研究成果

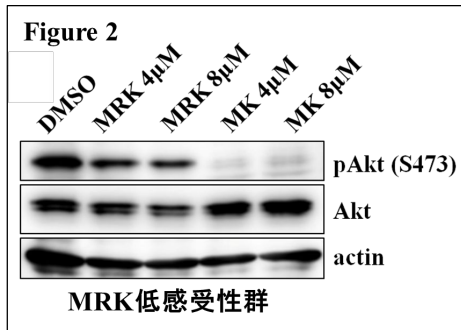
患者由来膠芽腫幹細胞とNotch阻害剤MRK003およびAkt阻害剤MK2206の解析を行うことにより下記を明らかにした。

(1)MRK003高感受性群と低感受性群に対してMK2206単剤の効果を比較した。全ての膠芽腫幹細胞に対し細胞増殖抑制を示したが、2群間でMK2206のIC50に有意差は認めなかった。(Figure 1)

Figure 1



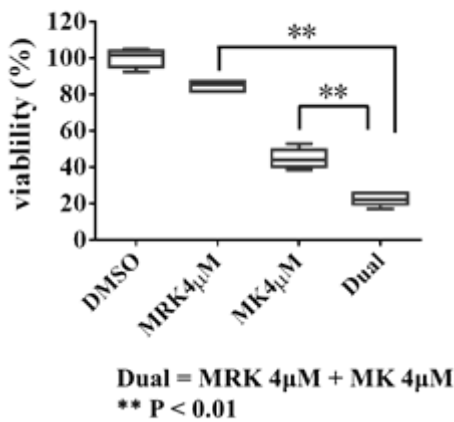
(2)MRK 低感受性群において MK2206 は著明にリン酸化型 Akt 蛋白発現レベルを減少させた (Figure 2)。



(3) MRK003 低感受性群に対し、Notch 阻害剤および Akt 阻害剤の単剤と 2 剤併用を比較すると、2 剤併用は単剤よりも細胞増殖抑制、幹細胞形質維持の抑制、アポトーシス誘導の増強が認められた。

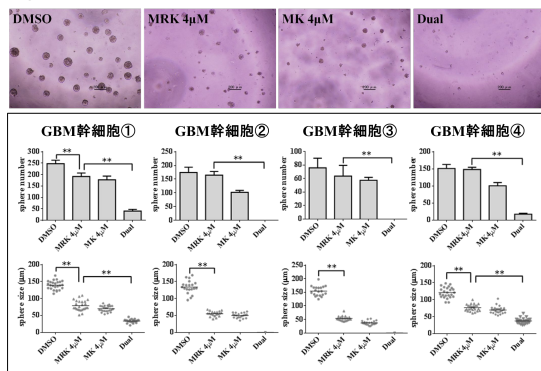
2 剤併用は単剤よりも細胞増殖抑制効果を示した (Figure 3a)。

Figure 3a



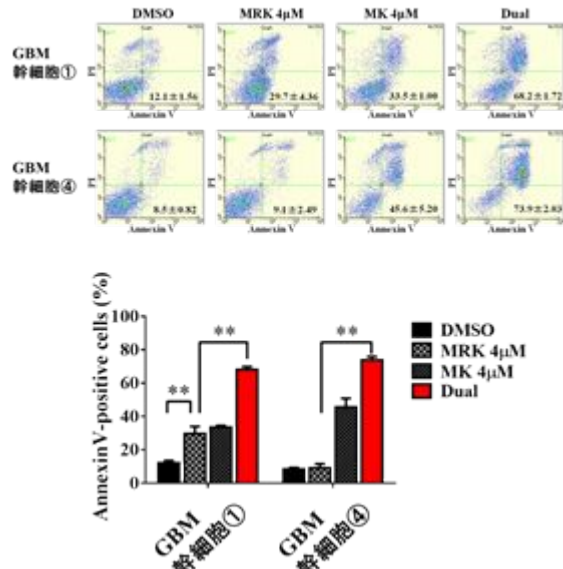
2 剤併用は単剤と比較し著明に sphere 数の減少および大きさの縮小が認められた。(Figure 3b)

Figure 3b



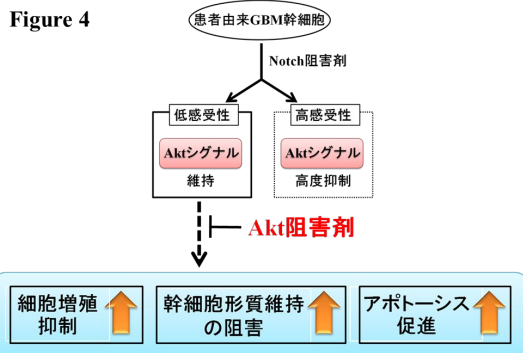
2 剤併用は単剤よりもアポトーシスの割合が増加した (Figure 3c)。

Figure 3c



以上のことから、Notch 阻害剤 MRK003 低感受性膠芽腫幹細胞は、MRK003 に Akt 阻害剤 MK2206 を併用することによって細胞増殖抑制および幹細胞形質維持の抑制、アポトーシス促進の増強効果が認められた。その増強効果のメカニズムとして Akt シグナル阻害が関与していると考えられた。

(Figure 4)



近年、がん幹細胞を標的とする新たな治療法の確立が重要とされている。Notch シグナル阻害に Akt シグナル阻害を追加することによって Notch 阻害剤抵抗性膠芽腫幹細胞を制御可能であることが示唆された。この結果は、新たな治療につながる可能性があると考えられる。今後は、動物実験における MRK003 と MK2206 の併用効果を解析し臨床応用への可能性を探る予定である

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 2 件)

1. 東馬 康郎, 田中 慎吾, 吉川 陽文, 木多 眞也
眼窩内海綿状血管奇形を合併した頭蓋硬膜動静脈瘻の 1 例
脳卒中 J-STAGE (早期公開 2016 年 12 月 27 日)
doi: 10.3995/jstroke.10479 (査読有り)
2. Kinoshita M, Nakajima R, Shinohara H, Miyashita K, Tanaka S, Okita H, Nakada M, Hayashi Y.
Chronic spatial working memory deficit associated with the superior longitudinal fasciculus: a study using voxel-based lesion-symptom mapping and intraoperative direct stimulation in right prefrontal glioma surgery.
J Neurosurg. 2016 Oct;125(4):1024-1032.
(査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1. 田中慎吾, 東馬康郎、吉川陽文、木多眞也
早期・後期 Arterial spin labeling (ASL)法による CAS 後過灌流の予測
日本脳卒中学会、平成 29 年 3 月 16-19 日、大阪
2. 田中慎吾, 東馬康郎、吉川陽文、木多眞也
頸動脈ステント留置 1 ヶ月後に症候性再狭窄を生じた一例
第 25 回北陸 IVNR 研究会、平成 29 年 1 月 21 日、金沢
3. 田中慎吾, 東馬康郎、吉川陽文、木多眞也
外科的治療を施行した中高年者の症候性くも膜嚢胞の 3 例
第 75 回日本脳神経外科学術総会、平成 28 年 9 月 29 - 10 月 1 日、福岡
4. 田中慎吾, 東馬康郎、吉川陽文、木多

- 眞也
頭部外傷 5 年後に発症した後頭部皮下動静脈瘻
第 91 回日本脳神経外科学会中部支部学術集会、平成 28 年 9 月 17 日、浜松
5. 田中慎吾, 東馬康郎、吉川陽文、木多眞也
第 4 脳室内腫瘍の 2 例 ~ trans-cerebellomedullary fissure approach を経験して ~
第 7 回 Kanazawa Kyoto Friendship Conference (KKFC)、平成 28 年 7 月 9 日、福井
 6. 田中慎吾, 東馬康郎、吉川陽文、木多眞也
診断に難渋している播種をきたした脳腫瘍の 1 例
第 53 回北陸脳腫瘍懇話会、平成 28 年 6 月 11 日、金沢
 7. 田中慎吾, 東馬康郎、吉川陽文、木多眞也
高齢発症の症候性鞍上部クモ膜嚢胞の 1 例
第 223 回福井脳・神経疾患談話会、平成 28 年 4 月 22 日、福井
 8. 田中慎吾, 東馬康郎、村松直樹、木多眞也
進行性の左片麻痺で発症した上矢状静脈洞内に完全浸潤を伴う傍矢状洞髄膜腫の 1 例
第 90 回日本脳神経外科学会中部支部学術集会、平成 28 年 4 月 9 日、富山
 9. 田中慎吾, 中野伊知郎、平尾敦、中田光俊
Notch 阻害剤抵抗性膠芽腫幹細胞に対する Akt 阻害剤併用の有効性
第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会、平成 27 年 12 月 6 - 8 日、京都
 10. 田中慎吾, 平尾敦、中野伊知郎、藤堂具紀、稲生靖、中田光俊

膠芽腫幹細胞に対する γ -セクレター
ゼ阻害剤 MRK003 の効果と感受性マ
ーカーの解析

第 74 回日本脳神経外科学術総会、平成
27 年 10 月 14 - 16 日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 慎吾 (TANAKA SHINGO)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：40507084

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()