

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19979

研究課題名(和文) 脳腫瘍幹細胞に対する分子標的療法の研究

研究課題名(英文) The study of molecular target therapy for brain tumor stem cells

研究代表者

菊地 亮吾 (Kikuchi, Ryogo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10594723

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)：悪性神経膠腫に対し、MIFおよび新規腫瘍抗原DEPDC1についての機能解析を行った。MIFは脳腫瘍幹細胞およびglioma細胞において、p53と結合してその機能を阻害していることが示唆され、MIFの発現抑制がin vivoモデルでの腫瘍増殖を抑制した。DEPDC1はglioma細胞においてNF- κ Bシグナルを介して細胞増殖に働き、誘導脳腫瘍幹細胞を用いたin vivoモデルにおいて、DEPDC1の発現抑制が生存期間を延長した。以上の結果よりMIFおよび新規腫瘍抗原DEPDC1はgliomaにおける治療標的として有用であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of MIF and novel oncoantigen, DEPDC1, in malignant glioma. MIF bound directly to p53 and inhibited its function in brain tumor stem cells and glioma cells. MIF knockdown inhibited tumor progression in mouse brain tumor model. DEPDC1 promoted cell proliferation through NF- κ B signaling pathway in glioma cells. DEPDC1 knockdown prolonged overall survival in mouse model using induced brain tumor stem cells. Our data suggested that MIF and DEPDC1 were useful target molecules for the treatment of glioma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍幹細胞 悪性神経膠腫 MIF DEPDC1

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍の代表格である膠芽腫の標準治療は、脱落症状を呈さない範囲での最大限の手術摘出と、引き続き temozolomide を用いた化学療法と放射線療法を組み合わせた集学的療法であるが、近年でもその生存予後は1.5年程度と過去数十年間ほとんど改善していない。近年保険適用となった bevacizumab も QOL の改善は認められるも全生存期間の延長は示されていない。

臨床においては特に術前画像・術中所見にて判別できない正常脳への腫瘍細胞の浸潤が問題であり、これに対して腫瘍特異的に作用する新たな分子標的療法の開発が望まれる。昨今のがん研究の進展により、腫瘍に含まれるごくわずかな腫瘍幹細胞が、腫瘍の発生と維持、そして治療抵抗性に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。さらに脳腫瘍幹細胞 (BTSC) は周辺脳実質に強く浸潤する性質を有し、実臨床での治療効果を改善するためには、周辺脳に浸潤する BTSC の根絶が、最重要課題であると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者は定量 PCR 法を用いて BTSC に macrophage migration inhibitory factor (MIF) が特異的に高発現していることを確認し、また glioma に発現がみられた新規腫瘍抗原として DEPDC1 に着目し、悪性神経膠腫および BTSC での発現を確認した。これらの研究成果から、MIF および DEPDC1 を含む新規腫瘍抗原は、分子標的療法のターゲットとして望ましいと考えられた。臨床応用に向けて in vitro での機能解析および in vivo での治療実験を行う。

3. 研究の方法

研究代表者らが単離した BTSC を用いた膠芽腫モデルマウスおよび共同研究を行う慶應義塾大学医学部先端医科学研究所遺伝子制御研究部門で作成されたマウス誘発脳腫瘍幹細胞 (imBTSC) モデルを用い、以下の方法で実験を行った。

(1) BTSC における MIF の機能解析

これまでの研究で glioma 細胞において MIF が核内で p53 と結合しその機能を阻害していることを確認しており、単離した BTSC において MIF と p53 の関係について機能解析を行った。

単離した BTSC である hG008 に lenti virus を vector として MIF shRNA および control shRNA を infection し、MIF の持続的な knockdown 細胞を作成し、細胞増殖能の変化を測定した。

次に p53 と MIF を同時に knockdown し、細胞増殖抑制効果を検討した。

(2) ヒト BTSC 移植マウスに対する MIF をターゲットとした治療実験

MIF shRNA および control shRNA を infection した hG008 を NOD/SCID マウス脳内 (右線条体) に 1×10^5 cells 移植し、MIF の knockdown による in vivo 治療効果を生存期間で検討した。

(3) ヒト glioma 細胞における新規腫瘍抗原 DEPDC1 の発現・機能解析

新規腫瘍抗原 DEPDC1 がヒト glioma 細胞において発現していることは確認しており、BTSC および imBTSC ついて、定量 PCR, Westernblot を用いて発現解析を行った。

次にヒト glioma 細胞 U251 および U87 において DEPDC1 siRNA を用いて DEPDC1 の発現を抑制することで、細胞増殖に与える影響、NF B に対する影響、アポトーシスに与える影響を調べた。

(4) BTSC および誘発脳腫瘍幹細胞における新規腫瘍抗原 DEPDC1 の発現解析および治療実験

単離した BTSC およびマウス誘発脳腫瘍幹細胞から蛋白・RNA を抽出し、新規腫瘍抗原 DEPDC1 について定量 PCR, Westernblot を用いた発現解析を行った。

マウス誘発脳腫瘍幹細胞に lenti virus を vector として DEPDC1 shRNA および control shRNA を infection し、DEPDC1 の持続的な knockdown 細胞を作成した。これを C57/BL6 マウス脳内に 1×10^4 cells 移植し、DEPDC1 の knockdown による in vivo 治療効果を生存期間で検討、また組織を HE 染色で解析した。

4. 研究成果

(1) BTSC における MIF の機能解析

単離した BTSC に MIF shRNA を用いて発現を抑制すると、p53 の発現は変化しないまま BTSC の細胞増殖が抑制された。また、p53 の発現を抑制すると MIF shRNA による細胞増殖抑制効果が減少した。

glioma 細胞での解析と合わせ、BTSC においても MIF が p53 と結合してその機能を阻害していることが示唆された。

(2) ヒト BTSC 移植マウスに対する MIF をターゲットとした治療実験

MIF shRNA を導入した hG008 を移植した脳腫瘍モデルでは、control shRNA を導入した hG008 に比べ、有意な生存期間延長がえられた。

(3) ヒト glioma 細胞における新規腫瘍抗原 DEPDC1 の発現・機能解析

ヒト glioma 細胞 U251 および U87 を用いた in vitro での機能解析を行った。DEPDC1 は glioma 細胞において、NF B シグナルを介し

て細胞増殖に働いた。DEPDC1 を抑制すると、temozolomide の作用と相加的に細胞増殖障害作用を示した。また DEPDC1 は、BTSC では直接的には細胞増殖には働いていないものの、分化した細胞では細胞増殖に働くことが示唆された。

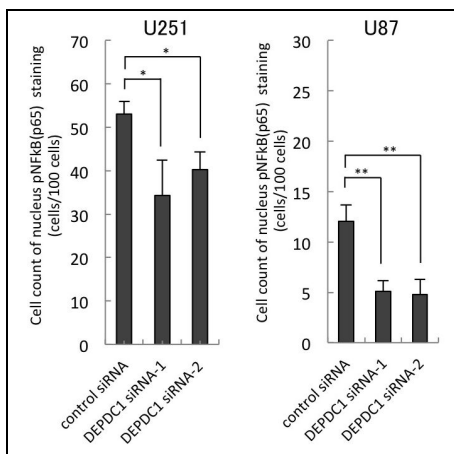


図 1. DEPDC1 抑制時の pNF B の核内発現

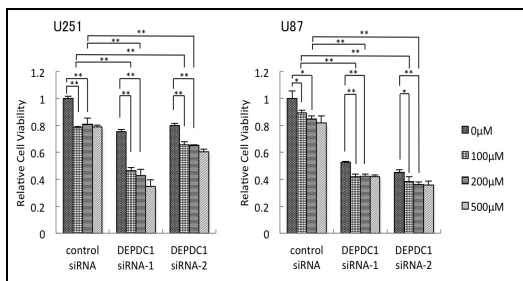


図 2. DEPDC1 と Temozolomide の相互作用

(4) BTSC および誘導脳腫瘍幹細胞における新規腫瘍抗原 DEPDC1 の発現解析および治療実験

BTSC および iBTSC における新規腫瘍抗原 DEPDC1 の発現を western blot を用いて確認した。iBTSC を用いたマウス脳腫瘍モデルにおいても DEPDC1 の発現を確認した。

DEPDC1 shRNA を導入した iBTSC を移植した脳腫瘍モデルでは、control shRNA を導入した iBTSC を移植した群に比べ、有意な生存期間延長がえられた。

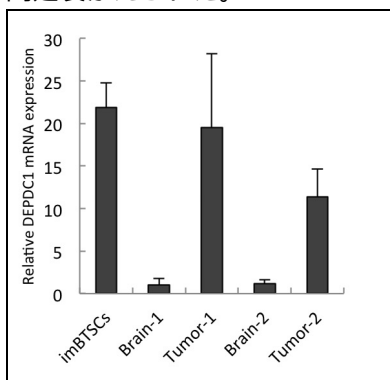


図 3. iBTSC モデルでの DEPDC1 発現

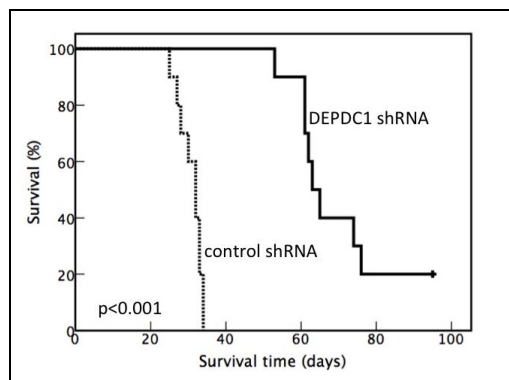


図 4. iBTSC モデルにおける DEPDC1 抑制の影響

以上の結果より MIF および新規腫瘍抗原 DEPDC1 は glioma における治療標的として有用であることが確認された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

菊地亮吾, 戸田正博, 田村亮太, 他. 再発悪性神経膠腫に対するカクテルペプチドワクチン療法第 1/2 相臨床試験. 第 34 回日本脳腫瘍学会学術総会. 2016/12/4-5. 甲府富士屋ホテル (山梨県・甲府市).

菊地亮吾, 戸田正博, Sampetean Oltea, 他. 悪性神経膠腫に対する新規標的抗原 DEPDC1 の機能解析. 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会. 2016/9/29-10/1. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市).

菊地亮吾, 戸田正博, 長島秀明, 他. 悪性神経膠腫に対するペプチドワクチン療法の臨床試験および新規標的抗原 DEPDC1 の解析. 第 33 回日本脳腫瘍学会学術総会. 2015/12/6-8. グランドプリンスホテル京都 (京都府京都市).

Ryogo Kikuchi, Masahiro Toda, Oltea Sampetean, et al. Expression and Functional Analysis of an oncoantigen, DEPDC1, in malignant glioma. 20th Annual Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting. 2015/11/19-22. San Antonio Marriott Rivercenter. (San Antonio, USA).

菊地亮吾, 戸田正博, Sampetean Oltea, 他. 悪性神経膠腫における新規標的抗原 DEPDC1 の発現・機能解析. 日本脳神経外科学会第 74 回学術総会. 2015/10/14-16. ロイトン札幌 (北海道札幌市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 亮吾 (KIKUCHI, Ryogo)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10594723

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし