

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18591611
 研究課題名（和文） 脳腫瘍に対する温度可逆性ポリマーを用いたドラッグデリバリーシステムの開発
 研究課題名（英文） Novel drug delivery system using thermo-reversible polymer for brain tumor
 研究代表者 常喜 達裕（JOKI TATSUHIRO）
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：30226378

研究成果の概要（和文）：

温度可逆性ポリマーとプロテオソーム阻害剤の一種であるMG132を組み合わせた局所療法の研究を行った。MG132が、5種類の脳腫瘍細胞を薬剤暴露後約24時間で細胞死に至らせることが明らかとなった。蛍光免疫染色では、細胞質内にMG132により分解処理できなくなった大量のタンパクが集積していることを確認した。MG132を包埋した温度可変性ポリマーは、脳腫瘍に対する新しい局所療法になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

MG132, a proteasome-inhibitor, has been shown to induce apoptosis of experimental malignant cells *in vitro*. However, its systemic toxicity prevents further use in clinical settings. To circumvent this toxicity, MG132 can be delivered directly to the tumor. We tested the efficacy of MG132 incorporated into thermoreversible gelation polymer (TGP) for treating experimental glioma cell lines were measured with MTT-assays. As a caspase activity assay, the activities for caspases 3, 8 and 9 were measured in a CytoFluor Multiwell Plate Reader. A significant increase in cleavage activities of caspases 3, 9, and 8 detected in caspase cleavage assay results was observed in both cell lines. MG132 exhibits potent cytotoxic-activity against U87MG and T98G *in vitro*, it can be efficiently incorporated and delivered using TGP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	810,000	4,210,000

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：脳腫瘍、プロテオソーム阻害剤、ポリマー、ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の治療法には、手術、放射線治療、化学療法がある。しかし、全身投与による化学療法は脳血管関門の存在から脳腫瘍に対しては効果に限界がある。また、悪性脳腫瘍が髄腔内播種は起こすが遠隔転移を起こさないという特性から本疾患に最も適した術後化学療法は全身投与ではなく脳局所療法であり、有効なドラッグデリバリーシステムの開発は治療に苦慮している本疾患に対して福音となる。

これまでに我々は、温度可変性ポリマーを用いた新たなドラッグデリバリーシステムの開発を研究し報告してきた。近年、プロテオソーム阻害剤が各種の悪性腫瘍細胞に対して抗腫瘍効果を持つことが報告された。悪性脳腫瘍細胞に対しては、明らかな効果が解明されていないためプロテオソーム阻害剤の神経系腫瘍培養細胞に対する抗腫瘍効果を検討することは脳腫瘍治療に新たな治療法を提供することとなる。さらに温度可変性ポリマーとプロテオソーム阻害剤の併用することにより抗腫瘍効果を示せば新たな脳腫瘍治療法となると考え研究を行った。

2. 研究の目的

温度可変性ポリマー包埋プロテアソーム阻害剤によるヒト脳腫瘍細胞での細胞障害の評価

目的：神経系腫瘍培養細胞に対するプロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果を評価する目的で、神経系腫瘍培養細胞を用いた実験を行った。

細胞内では不要になった蛋白質は鎖状に連なったユビキチン(ポリユビキチン)によって標識され、プロテアソーム系によって分解を受ける。このプロテアソーム系を阻害すると、細胞内では蛋白質の分解機構が働かなくなり、細胞機能は障害される。腫瘍細胞は正常細胞よりもプロテアソーム阻害剤に対する感受性が高いことから、その抗腫瘍効果が注目されている。ドラッグデリバリーに応用する薬剤の一つとしてプロテアソーム阻害剤に着目し、その抗腫瘍効果を評価した。特に、ユビキチン化された不要蛋白質の蓄積部位を形態学的に評価し、さらに、アポトーシスの関連を評価することで抗腫瘍効果が得られるメカニズムを検討した。

3. 研究の方法

プロテアソーム阻害剤による神経系腫瘍細胞の細胞障害の評価

方法：ヒト膠芽腫由来細胞(U-87MG,T98G)、ヒト髄芽腫由来細胞(DAOY,D283,ONS-76)、ヒト神経芽細胞腫由来細胞(SH-SY5Y)を用いた。プロテアソーム阻害剤(MG132)を 1-10 μ M の濃度で 6-48 時間処理した後、以下の実験に用いた。

1) MTT 法を用いて殺細胞効果の評価した。

2) プロテアソーム阻害剤処理による細胞周期の変動、アポトーシスの誘導を評価するために、BrdU-7-AAD を用いて細胞をラベルし、フローサイトメトリーで評価した。

3) 培養細胞から蛋白質を抽出し、caspase activity assay によるアポトーシス誘導を評価した。蛋白質抽出にはアルカリ抽出法を用いた。

4) 培養細胞から蛋白質を抽出し、Western Blot 法にて細胞内に蓄積したユビキチン化蛋白質を評価した。蛋白質抽出にはアルカリ抽出法を用いた。

5) 培養細胞を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、各種抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、細胞の形態変化、細胞内のユビキチン化蛋白質の蓄積様式を評価した。

4. 研究成果

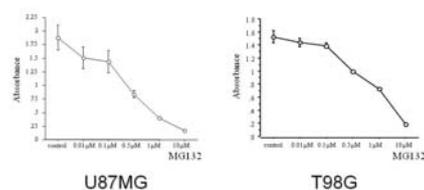
プロテアソーム阻害剤による神経系腫瘍細胞の細胞障害の評価と機序の解明

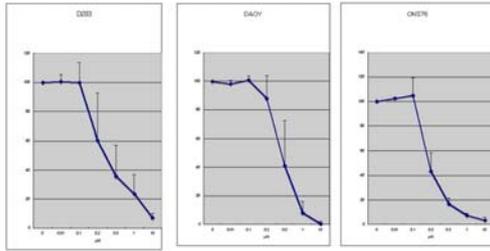
結果：

1) MTT 法による殺細胞効果の評価

ヒト膠芽腫由来細胞 2 細胞 (U87MG, T98G) 及びヒト髄芽腫細胞(DAOY,D283,ONS-76)において濃度依存性に抗腫瘍効果を認めた。IC50 は、どの細胞も 0.5 μ M であった。

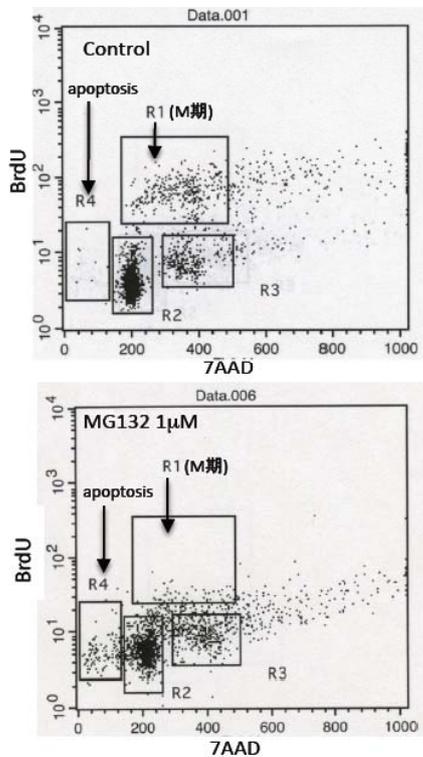
Cell proliferation assay - Glioma -





2) プロテアソーム阻害剤処理による細胞周期の変動、アポトーシスの誘導
 プロテアソーム阻害剤処理により、対象としたすべての細胞においてM期 (図 R1) の細胞が高度に減少、細胞周期の停止 (cell cycle arrest) が誘導された。アポトーシスの誘導 (図 R4) も観察されたが、割合は低かった (~5%)。

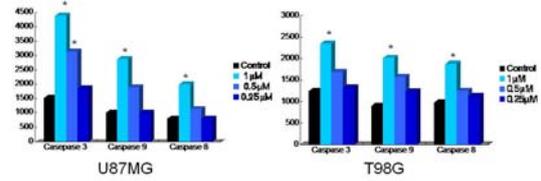
Neuroblastoma cell line (SH-SY5Y)



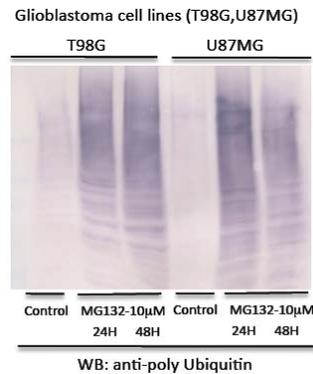
3) caspase activity assay によるアポトーシス誘導機序の解明
 ヒト膠芽腫由来細胞 2 細胞 (U87MG, T98G) から抽出したタンパク質を用いた cleavage activity assay において caspase 3,8,9 の活性が上昇しており、これらの活性化が細胞

内にアポトーシスを惹起し細胞死の誘導に関与している可能性が示唆された。

Caspase activation assay



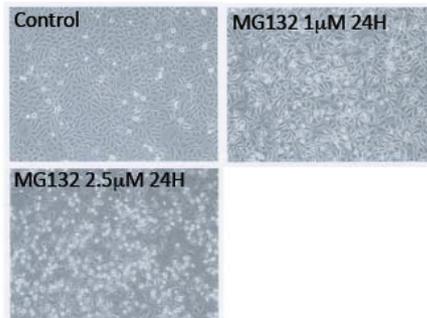
4) Western Blot 法による細胞内に蓄積したユビキチン化蛋白の評価
 対象とした各種の腫瘍培養細胞では、プロテアソーム阻害剤の処理により細胞内にポリユビキチン化を受けた蛋白の蓄積を認めた (図)。



5) プロテアソーム阻害剤処理による細胞形態の変化、細胞核内、細胞質内の Ubiquitin 化蛋白の蓄積

対象とした各種の腫瘍培養細胞はプロテアソーム阻害剤処理によって、細胞質の収縮、および円形化を起こし、接着性を有する細胞は接着性が低下、剥離する傾向を示した (図)。

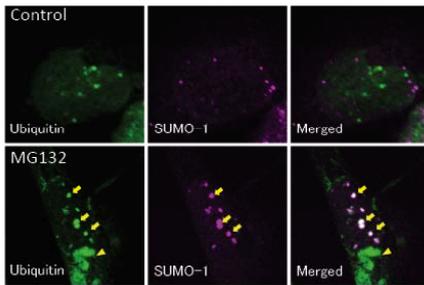
Medulloblastoma cell line (ONS-76)



プロテアソーム阻害剤処理を行うと、細胞の核内 (図矢印)、および細胞質内 (図矢頭) の両

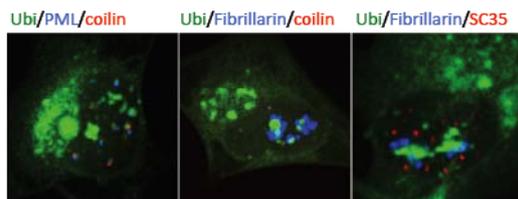
方にユビキチン化蛋白の蓄積を認めた。

Neuroblastoma cell line (SH-SY5Y)



核内に蓄積したユビキチン化蛋白は、Promyelocytic leukemia protein(PML)、coilin、Fibrillarin と共存し(図)、核内の転写調整に関わる PML nuclear body、スプライシングに関わる Cajal body、RNA 合成に関わる核小体に蓄積することが明らかとなった。

Neuroblastoma cell line (SH-SY5Y)



検索に用いた神経系腫瘍細胞では、プロテアソーム阻害剤の処理により、細胞周期の停止が主として観察され、プロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果が確認された。プロテアソーム阻害により腫瘍細胞内にはユビキチン化蛋白が高度に蓄積、特に核内の転写調節、RNA 合成に関わる機能ドメインに蓄積することが判明した。これらの核内ドメインの機能障害が、プロテアソーム阻害剤の抗腫瘍効果の一要因であることが示唆される結果であった。

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1件)

① Arai T, Joki T, Akiyama M, Agawa M, Mori Y, Yoshioka H, Abe T. Novel drug delivery system using thermoreversible gelation polymer for malignant glioma. J Neurooncol. 2006 Mar;77(1):9-15

〔学会発表〕(計6件)

① 常喜達裕、藤ヶ崎純子、荒井隆雄、阿部俊昭 脳腫瘍に対する温度可逆性ポリマー

を用いた新たなドラッグデリバリーシステムの開発 第27回日本脳腫瘍学会 2009年11月大阪

② 常喜達裕、藤ヶ崎純子、荒井隆雄、阿部俊昭 脳腫瘍に対する温度可逆性ポリマーを用いた新たなドラッグデリバリーシステムの開発 第26回日本脳腫瘍学会 2008年11月松山

③ 常喜達裕、藤ヶ崎純子、荒井隆雄、阿部俊昭 脳腫瘍に対する温度可逆性ポリマーを用いた新たなドラッグデリバリーシステムの開発 日本脳神経外科学会第67回学術総会 2008年10月盛岡

④ 藤ヶ崎純子、高田耕司 プロテアソーム阻害により神経系細胞に形成される Ubiquitin-SUMO陽性構造物と核内止め人との関連 第49回日本神経病理学会総会学術研究会 2008年5月東京

⑤ 常喜達裕、藤ヶ崎純子、荒井隆雄、阿部俊昭 脳腫瘍に対する温度可逆性ポリマーを用いた新たなドラッグデリバリーシステムの開発 第25回日本脳腫瘍学会 2007年11月台場

⑥ 常喜達裕 プロテオソームインヒビターと温度可逆性ポリマーを用いた新たな脳局所療法の開発 日本脳神経外科学会第66会総会 2007年品川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常喜 達裕 (JOKI TATSUHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30226378

(2) 研究分担者

藤ヶ崎 純子 (FUJIGASAKI JUNKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60312021