

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591866

研究課題名（和文） オートファジー誘導による悪性グリオーマ治療抵抗性克服の試み

研究課題名（英文） Overcome of resistance to therapy of malignant gliomas by induction of autophagy

研究代表者

栗本 昌紀（KURIMOTO MASANORI）

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：10161770

研究成果の概要（和文）：

悪性グリオーマ細胞は、抗癌剤や放射線に対して抵抗性である。この病態の大きなメカニズムが悪性グリオーマ細胞のアポトーシス抵抗性にある。一方、第二のプログラム細胞死と言われるオートファジーは、悪性グリオーマの細胞死のメカニズムとして重要である。われわれは、薬理学的手法を用いて培養グリオーマ細胞にオートファジーが誘導可能かどうかを検討した。その結果、アポトーシス阻害剤やオートファジー促進剤で悪性グリオーマ細胞にオートファジーの誘導が生じることを明らかにした。この方法は治療抵抗性の悪性グリオーマにおける新たな戦略と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Malignant glioma cells are resistant to chemotherapeutic agents and irradiation. The resistance to apoptosis is the main mechanism of this resistance to therapy. The second programmed cell death mechanism, autophagy is now important cell death process of malignant glioma cells. The authors investigated possibility of autophagy induction of malignant glioma cells by pharmaceutical methods. Antiapoptotic drugs and autophagy inducing drugs induced glioma cell autophagy. This strategy may be a novel therapeutic method of malignant gliomas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脳腫瘍学、悪性グリオーマ、オートファジー、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、上皮性癌細胞を始めとする一部の腫瘍細胞と同様、放射線感受性が低く、アポトーシス抵抗性であり、強力な放射線をかけて初めて生じる細胞死の形態と分子メカニズムはオートファジーであることが最近知られるようになった。また悪性グリオーマ細胞が各種の抗癌剤や放射線に対して治療抵抗性を示す主なメカニズムとして、転写活性因子である細胞内NF- $\kappa$ B活性が高く、一旦悪性グリオーマ細胞に抗癌剤や放射線のトリガーが入るとさらにNF- $\kappa$ Bが異常に活性化され、最終段階でcaspaseが活性化されアポトーシスに至る各種の経路に抑制的なメカニズムが働くと同時に、抗アポトーシス作用のあるbcl 2以下のシグナル伝達回路の促進作用もあることが知られている。さらに最近、放射線治療抵抗性癌細胞では、アポトーシスを抑制するとオートファジーが誘発され、しかも放射線感受性が高まることが報告された。逆に、オートファジーを抑制するとアポトーシスで死に至る癌細胞があることも観察されている。このことは、アポトーシスとオートファジーにクロストークがある可能性を示唆している。我々は難治性の悪性グリオーマ細胞死の鍵はオートファジーにあり、治療の突破口はオートファジーの誘導であると着想するに至った。そこで治療抵抗性悪性グリオーマ細胞におけるオートファジーの本態、アポトーシスとのクロストークの可能性につい

て調べることにした。

## 2. 研究の目的

我々のこれまでの研究実績を踏まえ、治療抵抗性悪性グリオーマ細胞におけるオートファジーの本態、アポトーシスとのクロストークの病態につき、放射線・抗がん剤治療後の形態学的、生化学的細胞変化に関する基礎研究より解明を図る。すなわち、

1) 各種悪性グリオーマ細胞株を用い、細胞障害性のある放射線照射や抗癌剤暴露がアポトーシスではなくオートファジーを起こすのかどうかを解明する。そのためには、形態の観察に加え、アポトーシスに関係しているcaspaseなどを、またオートファジーと関係が知られているLC3などのタンパクレベルの発現解析を行い比較検討する。

2) 次に、既知のアポトーシス阻害剤でもあるNF- $\kappa$ B阻害剤存在下、あるいはオートファジー阻害剤／促進剤の存在下に悪性グリオーマ細胞株に細胞障害性ストレスを加え、NF- $\kappa$ Bの活性化が抑制されるかどうか、同時にアポトーシスやオートファジーのプロセスが促進されるかどうかを調べたい。このことでNF- $\kappa$ B活性化がアポトーシスの抑制だけでなくオートファジーの抑制にも関わっているのかどうか、さらにクロストークとしてオートファジー阻害剤によりアポトーシスが生じるか、アポトーシス阻害剤／オートファジー促進剤でオートファジーが生じるかどうか明らかに

したい。

### 3. 研究の方法

放射線照射後、抗癌剤使用後に生じる変化がアポトーシスかオートファジーのいずれであるのかを形態的におよび生化学的に以下のような手法で調べる。

1) 培養細胞としてA172細胞を用いる。培養細胞に放射線照射や cisplatin, temozolomideなどの抗癌剤添加による細胞障害性ストレスを加える。これらの状況下におけるアポトーシスとオートファジーの発生について次の染色方法と免疫ブロットを用いて観察する。放射線感受性、抗癌剤添加後の細胞生存率の検討はすべてMTTアッセイで行う。

a) Hoechst 33258染色を行い、細胞核の断片化を観察することでアポトーシスの発生を観察する。Acridine orangeによる染色を行い、オートファジーに特異的と言われるオートファゴゾームの発生を観察する。電子顕微鏡による超微細構造の検討を行う。

アポトーシスに関係するcaspase、オートファジーに関係するLC3の発現を免疫ブロットで調べる

NF- $\kappa$ Bの活性化について免疫ブロットで調べる

2) アポトーシス阻害状態、あるいはオートファジー阻害剤/促進剤の存在下に悪性グリオーマ細胞株に細胞障害性ストレスを加え生じる変化の観察

アポトーシス阻害剤 (caspase inhibitor) に加え既知のアポトーシス阻害剤でもある NF- $\kappa$ B 阻害剤 (pitavastatin) やオートファジー阻害剤である 3-methyl adenine (3-MA), bafilomycin、オートファジー促進剤の rapamycin, sodium butyrate を培地に加

えた条件で、グリオーマ細胞に放射線照射あるいは抗癌剤に暴露させる。このような条件下で、上記1の内容の細胞に生じる形態変化やタンパク発現の変化、NF- $\kappa$ B の活性を調べる。

### 4. 研究成果

1) A172 細胞は、30Gy までの放射線照射と temozolomide 100  $\mu$ g/ml までの高濃度でも Hoechst 33258 染色における細胞核の断片化などのアポトーシスの発生は観察できず、Acridine orange によりオートファゴゾームの発生がみられた。電顕でもオートファゴゾームが観察された。免疫ブロットでは caspase の活性化は見られず、LC3 が一過性に増加した。したがってこれらの細胞障害性刺激に対する A172 の細胞死はオートファジーと考えられた。一方、cisplatin は A172 細胞に対して Hoechst 33258 染色にて細胞核の断片化を誘導し、免疫ブロットで caspase の活性化を起し、アポトーシスを誘導していると考えられた。

2) アポトーシス阻害剤 (caspase 阻害剤) あるいは NF- $\kappa$ B 阻害剤 (pitavastatin) の前処理を行った A172 細胞は、放射線照射と temozolomide に対して同様にオートファジーを起し、cisplatin でもアポトーシスは観察されず、オートファジーが生じた。

3) オートファジー阻害剤である 3-MA、bafilomycin で前処理した A172 細胞は、いずれも放射線照射と temozolomide に対する感受性が減少し、オートファジーを起こす細胞が減少していた。またアポトーシスを起こす細胞が増加した。Cisplatin に対してもアポトーシスは観

察されず、オートファジーが生じた。

4) オートファジー促進剤の rapamycin, sodium butyrate の前処理を受けた A172 細胞は、放射線照射と低濃度の temozolomide (1  $\mu$  g/ml)、cisplatin (100ng/ml) に対して感受性が増加し、オートファジーを起こす細胞が増加した。

5) アポトーシス阻害作用が知られている pitavastatin の存在下でオートファジー阻害剤の前処理を行った場合、A172 細胞は、放射線照射や cisplatin, temozolomide のいずれに対してもオートファジー死は促進された。またイムノブロットでは NF-kB の活性化が抑制されていた。

6) 以上の結果から NF-kB の阻害剤である pitavastatin は、放射線や抗癌剤暴露によるグリオーマ細胞のアポトーシスとオートファジーいずれも誘導していると考えられた。そのメカニズムとして NF-kB 活性化抑制に伴う細胞障害感受性の亢進が考えられた。アポトーシス阻害剤やオートファジー促進剤で悪性グリオーマ細胞にオートファジーの誘導が生じることを明らかにした。これらの薬理的な方法は治療抵抗性の悪性グリオーマにおける新たな治療戦略になりうると考えられた。

## 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 0 件)

[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

栗本 昌紀 (KURIMOTO MASANORI)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号: 10161770

### (2) 研究分担者

早川 由美子 (HAYAKAWA YUMIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教務補佐員

研究者番号: 30238092

遠藤 俊郎 (ENDO SHUNRO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医

学)・教授

研究者番号：70125269

(H21～H22 まで)

永井 正一 (NAGAI SHOICHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医

学)・助教

研究者番号：20372485

(H22～H23 まで)

林 央周 (HAYASHI NAKAMASA)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：50283073

(H22～H23 まで)