

## 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 6月 5日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～ 2011

課題番号：22791348

研究課題名（和文） Wnt シグナル制御による癌幹細胞および脳腫瘍増殖抑制作用の分子機構

研究課題名（英文） Mechanisms underlying regulation of Wnt signaling pathway against cancer stem- and glioma cells

研究代表者

溝渕 佳史 (MIZOBUCHI YOSHIFUMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80547993

研究成果の概要（和文）：

悪性神経膠腫に対する有効な治療法はなく、現在、生存率の改善はない。患者の延命を目的として、本研究では Wnt signal inhibitor、特に REIC/Dkk-3 の悪性神経膠腫に及ぼす作用に注目し、その機序として Wnt 蛋白と REIC との相互作用に着目した。まず悪性神経膠腫における Wnt シグナルの制御を行うため、アデノウイルスに REIC 遺伝子を組み込んだ Ad-REIC を用いて細胞増殖抑制作用を確認した。その分子機構として Ad-REIC による内因性アポトーシス誘導がみとめられた。また Wnt シグナルにおける REIC による Wnt 蛋白およびその各受容体との相互作用を調べ、Ad-REIC によって Wnt 蛋白が遺伝子レベルで発現抑制されることや、その受容体への結合を REIC が阻害することを明らかにした。さらに Wnt 蛋白の受容体への結合および機能に特異性があることを示し、Ad-REIC による Wnt シグナル抑制が悪性神経膠腫抑制に重要で、見込みのある治療法を提供する可能性を示した。現在、論文化を進めている。この結果を踏まえ臨床へのアプローチをおこなうために in vivo での検討を進めている

研究成果の概要（英文）：

Reduced expression in immortalized cells/Dkkofp-3 (REIC/DKK3, REIC), a tumor suppressor gene, has been investigated in gene therapy studies in various cancers. Elsewhere we first demonstrated that REIC was down-regulated in glioblastoma (GBM) cells, and that its over-expression with plasmid vector drastically inhibited their growth via activation of intrinsic apoptotic pathway. However, whether adenovirus-mediated overexpression of REIC (Ad-REIC) contributes to anti-tumor effect in glioma remain unclear. We performed this study to assess the applicability of Ad-REIC in GBM and to verify the molecular mechanisms underlying anti-tumor effect of Ad-REIC We first document that Ad-REIC effectively inhibited the growth of GBM in a time- and dose dependent manner and induced apoptosis. We also found that Ad-REIC reduced expression of Wnt proteins and its receptor LRP6 but not ROR2 Our data suggest that interfering the activation of both canonical- and non-canonical Wnt signaling pathway via overexpression of REIC contributes at least partly to suppress cell survival in GBM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

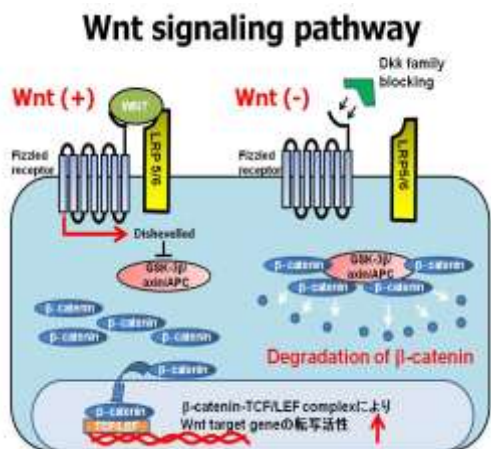
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍、REIC-Dkk3, Wnt シグナル

### 1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマは脳腫瘍において、最も浸潤能、組織破壊性が強く、手術療法、化学療法、放射線療法を組み合わせても、依然として治療効果が乏しい。現在ではグリオブラストーマの場合、平均生存期間は1年以内である。

Wnt は分泌型の glycoprotein であり、胚形成や皮質の発達に重要な役割を果たす。Ligand が Frizzleds といわれる 7 回膜貫通型の G-protein 受容体に結合し、いくつかの異なったシグナル伝達経路に作用する。最もよく知られた canonical pathway (図 1) では転写因子である  $\beta$ -catenin の安定化と核内移行に関与している。Wnt シグナルが off の状態では  $\beta$ -catenin はリン酸化され、ユビキチン化による蛋白分解を受ける。他に  $\beta$ -catenin 非依存的な Wnt シグナルも知られているが、その異なるシグナルの特異性は co-receptor と receptor の活性化と関係しており、canonical pathway では LRP-5, -6 が co-receptor として必要とされる。この canonical pathway の inhibitor である REIC/Dkk-3 は生体内ではさまざまな臓器に発現が確認されている。しかし脳腫瘍に関する報告はなく、申請者は REIC/Dkk-3 の低下が脳腫瘍の増殖に関係していることを見出し、また、REIC/Dkk-3 plasmid を遺伝子導入することにより REIC 蛋白を過剰発現させると、ミトコンドリアを介したアポトーシスが誘導されることを明らかにし、脳腫瘍における Wnt シグナルの重要性を証明した。(Neuro Oncol. 2008 Jun;10(3):244-53)



また脳腫瘍における Wnt signal のレセプターである LRP6 についての予備実験を行い、剖検例の正常脳および脳腫瘍の

正常部位では LRP6 は発現は低い、脳腫瘍の悪性度が高くなるに従い、LRP6 の発現は増加し、grade IV では LRP6 が強発現していることを見出している。

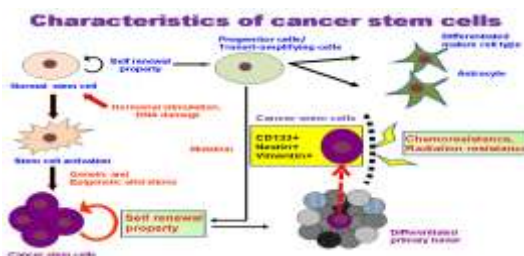
悪性脳腫瘍において Wnt signal 阻害物質である REIC/Dkk-3 が低下し、Wnt signal レセプターである LRP6 の発現が上昇している結果から、Wnt signal の活性化の増減が腫瘍細胞の増殖、細胞死に強く関与していることが推察され、その詳細な分子機構を解明することが、新しい治療薬の開発をもたらすことになると着想するに至った。現在では脳腫瘍に対して、効果的な遺伝子治療は存在していない

Wnt signal の阻害物質を脳腫瘍細胞に投与し、治療効果を研究することにより、悪性脳腫瘍に対する新治療をもたらすと考えられる。また Wnt signal の阻害物質の細胞内での分子機構を解明することにより、他の腫瘍に関しても、基礎的、臨床的に飛躍的発展をもたらすと期待される。

### 2. 研究の目的

悪性脳腫瘍における Wnt signal の関与と細胞内での分子機構の解明、動物モデルを用いた Wnt signal 阻害物質の生体内での治療効果確認することが、本研究の主たる目的である。

脳腫瘍効果が不十分な原因として脳腫瘍と正常細胞の境界に浸潤している癌幹細胞が薬物療法や放射線療法に強い耐性を示すことが原因の一つとして考えられている。この癌幹細胞は増殖が遅いけれども、自己再生能が強いことがわかっている (図 2)。脳



腫瘍効果をさらに検討していくためには癌幹細胞を用いた実験を行うことが必須と考えられる。そこで、研究期間内にヒトグリオブラストーマ組織から分離培養した癌幹細胞において、REIC/Dkk-3 の癌幹細胞抑制効果を確認し、腫瘍抑制効果の解析を行う。申請者により、脳腫瘍細胞、組織における REIC/Dkk-3 の抗腫瘍細胞効果および Wnt

signal レセプターLRP6 の蛋白および遺伝子発現についてはすでに明らかにしている。

1) 癌幹細胞において siLRP6 を行い、Wnt signal を阻害し、細胞増殖速度、細胞死の変化、細胞内での分子機構を解明する。またこれらの知見と REIC/Dkk-3 遺伝子導入の場合とを比較検討する。さらに生体内での治療効果の評価として、癌幹細胞を脳内に移植したヌードマウスを用いた脳腫瘍モデルを作成し、REIC/Dkk-3、siLRP6 を投与することによって、腫瘍の治療効果およびその分子機構を検討する。さらに

2) 最近の論文で、mammary progenitor cell では、Musashi 1 が Wnt の上流で REIC/Dkk-3 の発現を制御しており、また REIC/Dkk-3 は Musashi 1 の発現にも影響すると報告されている。この Musashi 1 が脳腫瘍細胞および癌幹細胞で REIC/Dkk-3 抑制に作用し Wnt signal が活性化されているか、活性化されていても REIC/Dkk-3 遺伝子導入により Musashi 1 の発現が抑制されるかどうかについて調べる。

### 3. 研究の方法

I. 本研究で使用する脳腫瘍由来の癌幹細胞は、術前にインフォームドコンセントを行い、許可を得た患者からの腫瘍組織から、癌幹細胞培養液を用いて、分離培養し、保存している癌幹細胞を使用する。

II. 申請者らの徳島大学脳腫瘍研究グループはヌードマウスの背部皮下に移植した担癌モデルを作成しており、また、ヌードマウスの腫瘍に対して、siRNA を投与する方法を確立している。(図)さらに

脳内に移植した脳腫瘍モデルを確立するための準備をしている。研究助成を受けられれば研究機関内に脳腫瘍モデルの確立および REIC/Dkk-3、siLRP6 の脳腫瘍細胞、脳腫瘍幹細胞に及ぼす効果を評価することが可能である。

#### 1. REIC/Dkk-3、LRP6、Musashi-1 蛋白



#### および遺伝子発現の解析

##### 腫瘍組織サンプルの免疫染色

術前にインフォームドコンセントを行い、許可を得た患者からの腫瘍組織の凍結切片を作成し、REIC/Dkk-3、LRP6 の抗体を用いて、免疫染色を行う。REIC/Dkk-3、LRP6 の免疫染色により、約 2 時間程度で REIC/Dkk-3、LRP6 の増減の度合いによって悪性脳腫瘍の診断が可能と考えている。Wnt signal の key protein を免疫染色する手段を診断の、1 手法として加えることにより、従来から行われている術中迅速標本、永久標本との組み合わせで、より正確な診断法を確立する。また、サンプル数を増やすことにより腫瘍組織での REIC/Dkk-3、LRP6 の発現の程度と腫瘍悪性度の相関関係を比較検討する。さらに Musashi-1 蛋白が REIC/Dkk-3 の発現と逆相関するかについて明らかにするため、同様に Musashi-1 の発現と局在を免疫染色で解析する。

##### 腫瘍組織サンプルの遺伝子解析

上記の腫瘍サンプルから、total RNA を抽出し、c-DNA に変換後、RT-PCR を用いて、REIC/Dkk-3、LRP6 の発現を調査し、遺伝子レベルでの診断、予後の予測に役立つ。

##### 2. siLRP6 の機能解析

###### 腫瘍細胞への siLRP6 の添加の影響

(1) 当教室にて患者から分離培養した初代グリオーマ細胞を培養する。

(2) SiRNA を用いて LRP6 を阻害することにより、腫瘍細胞増殖抑制効果の評価するため siLRP6 を培養液に添加する。

(3) MTT assay により生存細胞数を調べる。

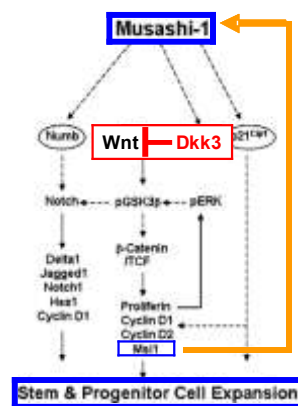
(4) 腫瘍細胞に LRP6 阻害物質を加え、また、SiLRP6 を行い、定量 RT-PCR や western blot 解析により、腫瘍増殖抑制効果に対する LRP6 の関与を評価する。

##### 3. Musashi-1 による REIC/Dkk-3 の制御機構解析(右図)

(1) 上記と同様に初代培養した細胞を用いてまず Musashi-1 の発現を調べ、正常細胞に比べて Musashi-1 の発現が高いことを確認する。

(2) SiRNA を用いて Musashi-1 を阻害することにより、腫瘍細胞増殖抑制効果の評価する。MTT assay により生存細胞数を調べる。

(3) 腫瘍細胞に Musashi-1 阻害物質を加え、定量 RT-PCR や western blot 解析により、



腫瘍増殖抑制効果に対する REIC/Dkk-3、および LRP6 発現の解析する。

#### 4. 研究成果

まず悪性神経膠腫における Wnt シグナルの制御を行うため、アデノウイルスに REIC 遺伝子を組み込んだ Ad-REIC を用いて細胞増殖抑制作用を確認した。その分子機構として Ad-REIC による内因性アポトーシス誘導がみとめられた。また Wnt シグナルにおける REIC による Wnt 蛋白およびその各受容体との相互作用を調べ、Ad-REIC によって Wnt 蛋白が遺伝子レベルで発現抑制されることや、その受容体への結合を REIC が阻害することを明らかにした。さらに Wnt 蛋白の受容体への結合および機能に特異性があることを示し、Ad-REIC による Wnt シグナル抑制が悪性神経膠腫抑制に重要で、見込みのある治療法を提供する可能性を示した。現在、論文化を進めている。この結果を踏まえ臨床へのアプローチをおこなうために in vivo での検討を進めている。癌幹細胞に対する作用について今後検討を行い、さらに ips 細胞の手技を応用した脳腫瘍モデルを確立するための準備を進めている。これらを応用した前臨床研究を進め、臨床応用の可能性を探求する予定である。

#### 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 4 件)

1. Nagahiro S, Mizobuchi Y, Hondo H, Kasuya H, Kamitani T, Shinbara Y, Nimura Y, Tomatsu T. Severe head injuries during Judo practice]. No Shinkei Geka. 2011; 39: 1139-47 (査読有)
2. Kageji T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H Clinical results of boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma. Appl Radiat Isot. 2011; 69: 1823-5. (査読有) DOI: 10.1016/j.apradiso.2011.05.029
3. Kageji T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H Long-survivors of glioblastoma treated with boron neutron capture therapy (BNCT). Appl Radiat Isot. 2011; 69: 1800-2 (査読有) DOI: 10.1016/j.apradiso.2011.03.021
4. Sako W, Morigaki R, Mizobuchi Y, Tsuzuki T, Ima H, Ushio Y, Nagahiro S, Kaji R, Goto S. Bilateral pallidal deep brain stimulation in

primary Meige syndrome. Parkinsonism Relat Disord. 2011; 17: 123-5 (査読有) DOI: 10.1016/j.parkreldis.2010.11.013

[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

溝渕佳史 (MIZOBUCHI YOSHIFUMI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号: 80547993

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: