

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591834

研究課題名(和文) 神経膠芽腫幹細胞を標的とした新規放射線治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new radiotherapy targeting stem cell of glioblastoma

研究代表者

野田 真永 (NODA, SHIN-EI)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60396645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫幹細胞にsiRNAによりGRP78を特異的にknockdownさせた細胞を用いて、細胞周期変化、照射による2重鎖DNA切断、細胞内代謝能変化を計測し、GRP78の放射線抵抗性のメカニズムを検証した。また in vivo でのGRP78 knockdownによる放射線感受性増感効果測定を行った。

研究成果の概要(英文)：cell cycle, DNA double strand break, intracell-metabolism, mechanism of radioresistance for GRP78 were verified using glioblastoma stem cell knockdowned GRP78 specifically by siRNA. Radiosensitization of glioblastoma stem cell were measured by GRP78 knockdown in vivo.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：神経膠芽腫 GRP78

1. 研究開始当初の背景

【背景】

神経膠腫は原発性脳腫瘍の中で最も発生率が高く、その中でも最もグレードの高い神経膠芽腫は生存期間中央値が約12ヶ月という難治性腫瘍である<sup>1)</sup>。神経膠腫では種々の生存・増殖シグナルのうち特に Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt 経路が活性化しており、その活性レベルがグレードおよび予後に大きく関与している<sup>2)</sup>。神経膠芽腫の治療法については、腫瘍が高度に浸潤性であるため、可及的腫瘍摘出後の放射線治療が必須である。現在までに治療成績向上させるべく標準治療である手術+放射線治療に様々な抗癌剤や分子標的薬が併用されてきた。

しかし、良好な成績が期待された PI3K のシグナル経路を抑制するべく、上流に位置する Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の阻害薬である Gefitinib と放射線治療の併用療法と、放射線治療単独群を比較する Radiation Therapy Oncology Group の第 I/II 相試験でも、両者の治療成績にほとんど差が認められなかった<sup>3)</sup>。

そこで PI3K が高度発現しているとき、その結合分子も高度発現しており、これを抑制することが神経膠芽腫の治療成績の向上につながるという仮説をたて、研究代表者らは Yeast Two-Hybrid 法によって、神経膠芽腫細胞における、PI3K の調節サブユニットである p85 と強力に結合する蛋白質を検索した。その結果、数種類の強力結合蛋白が同定され、その中の一つである、GRP78 に着目し、GRP78 を特異的に knockdown し、放射線による神経膠芽腫細胞死メカニズムを現在探索中である。(若手研究 B)

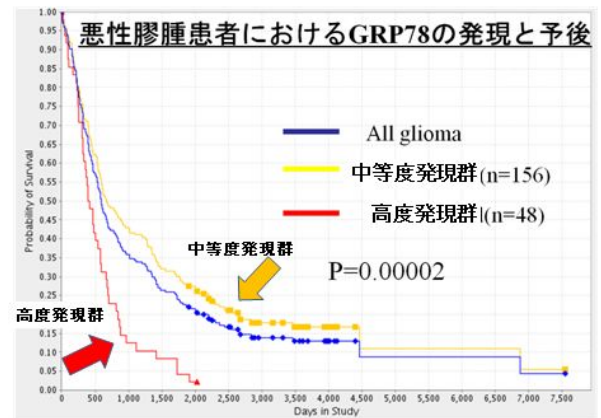
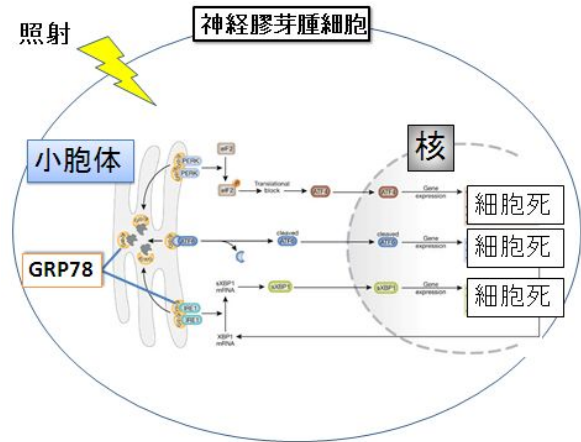


図1(左) GRP78 は通常、蛋白修復など細胞防御因子として働くが、照射など強力な小胞体ストレス反応時には GRP78 の制御が外れ、核内から細胞死シグナルが誘導される。

図2(右) 悪性膠腫患者では GRP78 が高度発現していると予後が著しく増悪する。

GRP78 は主に小胞体に存在する 78kDa の HSP70 ファミリーに属するシャペロン蛋白であり、癌細胞の中では生存・増殖および代謝機能などにおいて、非常に重要な役割を担っている。

小胞体は全細胞蛋白の約 1/3 に相当する分泌・膜蛋白の合成や不全蛋白の折り畳み修復を担う重要な器官である<sup>4)</sup>。細胞にストレスがかかると、小胞体膜上で GRP78 が制御している小胞体蛋白が活性化し、不全折り畳み蛋白反応と呼ばれる蛋白修復が行うことによって GRP78

はストレスに対する細胞防御の役割を果たしている。しかし、小胞体へのストレスが、不全蛋白の折り畳み修復能力を超えるとき、そのストレスレベルに応じて、細胞にはミトコンドリア経路を介してアポトーシスが引き起こされることが知られている(図1)。<sup>5,6)</sup>またオートファジーによる細胞死をたどることも報告されている。<sup>7)</sup>

GRP78は脳・肺・心臓といった正常組織においては発現が低度であるが、腫瘍においては高度に発現されることが知られている。<sup>6,8)</sup>また近年、腫瘍内にGRP78が強発現している乳癌・前立腺癌・脳腫瘍患者は化学療法抵抗性を示す臨床データも報告された。<sup>9-11)</sup>

またアメリカ国立がん研究所の gene tip data 解析によると、GRP78が高度発現している神経膠腫患者群は、中等度以下に発現している患者群に比べて予後が悪いというデータが公表されている(図2)。しかし、近年、神経膠腫幹細胞の存在が指摘されてきた。かつては、癌組織内において、全ての癌細胞は均一の形質を有しており、その形質の変化は生存に有利な変異を確率的に獲得することによって為されると考えられてきた。しかしながら、癌細胞はすべての細胞が無制限な分裂能力を有した均一な細胞集団ではなく、自己複製能と多分化能を有する幹細胞とそこから派生してできる分化した細胞からなるヘテロな集団であるという癌幹細胞モデルが提唱されてきた。<sup>1)</sup>

神経膠腫においても、細胞表面にCD133を発現する神経膠腫幹細胞の細胞は強い放射線抵抗性を示し、再発の原因細胞として働くことが示された。<sup>1)</sup>

そのため、分化した癌細胞のみならず、癌幹細胞を標的とした新規癌治療法の開発の必要性が叫ばれ始めた。

## 参考文献

- 1) Stupp R, et al. *Lancet Oncol.* 2009;10:459-66.
- 2) Chakravarti A, et al. *J Clin Oncol.* 2004;22:1926-33
- 3) Chakravarti A, et al. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2006;24:1527.
- 4) Kaufman RJ, et al. *J Clin Invest* 2002;110:1389-98
- 5) Ma Y, et al. *Nat Rev Cancer* 2004;4:966-77.
- 6) Li J, et al. *J Biol Chem* 2006;281:7260-70.
- 7) Kondo Y, et al. *Nat Rev Cancer* 2005;5:726-34.
- 8) Dong D, et al. *Hum Gene Ther* 2004;15:553-61.
- 9) Lee E, et al. *Cancer Res.* 2006;66:7849-53.
- 10) Pootrakul L, et al. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5987-93.
- 11) Pyrko P, et al. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):9809-16.
- 12) Ma Y, et al. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:966-77.

## 2. 研究の目的

1. 神経膠芽腫幹細胞における放射線抵抗性と小胞体ストレス応答の関連を明らかにすること。
2. 小胞体ストレス応答蛋白阻害薬併用放射線療法による神経膠芽腫の治療効果を in vitro および in vivo で検証すること。

## 3. 研究の方法

ヒト神経膠芽腫株 LN18, LN229, U87 を使用する。

これらを腫瘍原性が強い細胞のみが選択的に増殖する培養条件下腫瘍原性の強い細胞のみが選択的に増殖する培養条件下 (DMEM/F12

serum-free medium, B27, EGF, bFGF) で培養することで、高腫瘍原性能を持つ細胞を得て、これらが、神経膠腫幹細胞としての性質を持つことを、マウスへの移植実験・マーカー発現 (Nestin, CD133, CDXX) を中心に *in vitro* で確認する。

次に上記で得られる神経膠腫幹細胞をヌードマウスの右大脳半球に定位移植後、その生存の観察と腫瘍形成能を測定する。増大する移植細胞を切除摘出し、CD133、CDXX の発現割合を測定する。

この神経膠腫幹細胞がいかにしてその高い腫瘍原性能を維持しているのかを検討するために、脳腫瘍増大に大きく関与していることが知られている PI3K シグナル経路の関与を検討する。GRP78 はこれまでに脳腫瘍組織において高発現が認められるなど、脳腫瘍との関係性が報告されており、脳腫瘍の進展に重要な働きを示す因子の一つであることが知られているが、それが神経膠腫幹細胞においてどのような働きをしているのか、という点については、これまで知られていない。まず、GRP78 が神経膠腫幹細胞に対してどのように作用をしているのかを検討するために、GRP78 の働きを細胞内で抑える薬剤 (GRP78 阻害剤) を添加し、その影響を観察する。

次に RNA 干渉により、GRP78 の発現を抑制し、神経膠芽腫幹細胞の sphere 形成能、未分化マーカー Nestin 発現量および分化マーカー GFAP の発現量を確認する。これにより GRP78 の神経膠芽腫幹細胞の腫瘍原性能保持に対する関連度が明確になる。

放射線抵抗性を測定する。

神経膠芽腫幹細胞をヌードマウスに脳内移植し、6Gy の全脳照射を施行し、その生存および神経症状の観察と腫瘍形成能を測定する。

脳内で増大する移植細胞を切除摘出し、下記のごとく解析を行う

作成後は、ウェスタンブロットによる GRP78 蛋白発現, RTqPCR による mRNA レベルの GRP78 も測定し、続いて神経膠芽腫治療で頻用されるテモゾロミド(TMZ)併用 X 線照射群を解析に加え、上記手法により放射線増感効果を検証する。予備実験では LN18 において X 線 6Gy+TMZ 100nM を加えると、cleaved caspase 7 を経由して cleaved caspase 3 の強発現を認め、アポトーシスを起こすことが確認された。続いて、照射単独群および照射+TMZ 群に GRP78 阻害薬を併用し、その細胞死パターンおよび放射線感受性を検証する。神経膠芽腫細胞に X 線 6Gy 照射し、コロニー形成法, MTS アッセイにより、これらの細胞株の放射線生存率を測定する。

そして、X 線照射による神経膠芽腫細胞の細胞死のパターンおよび強く発現される経路をウェスタンブロットにより同定する。細胞死パターンは細胞の種類によって異なり、アポトーシス・オートファジー・細胞老化のいずれか、またはそれらの組み合わせの誘導を探索する。

また、放射線による最も中心的な殺細胞機構は DNA2 重鎖切断である。野生株、非特異的抑制株および GRP78 抑制株の DNA2 重鎖切断を測定するため、コメットアッセイ,  $\gamma$ H2Ax ア

ッセイを行う。

GRP78 は細胞照射後の DNA 修復に関与することを明らかにした。DNA2 重鎖切断修復に関しては、リン酸化 DNA-PKcs を始めとする DNA 修復蛋白と GRP78 との関連を、その発現および免疫共沈法によって調べていく。GRP78 による細胞周期調節はフローサイトメトリーによって解析する。

非照射 GRP78 抑制株では細胞が G1 期から放出され、放射線感受性の高い G2/M 期に細胞が蓄積されることを示唆した。これらのメカニズムによって、神経膠芽腫において、GRP78 は放射線感受性を低下させていることが *in vitro* で示唆された。

*in vitro* では GRP78 による照射後の細胞内代謝能を ATP アッセイによって測定する。また *in vivo* での GRP78 knockdown による放射線感受性測定を同時進行させる。

#### 4. 研究成果

神経膠芽腫幹細胞に siRNA により GRP78 を特異的に knockdown させた細胞を用いて、細胞周期変化、照射による 2 重鎖 DNA 切断、細胞内代謝能変化を計測し、GRP78 の放射線抵抗性のメカニズムを検証した。

放射線による神経膠芽腫細胞死メカニズムを GRP78 が Ca<sup>2+</sup>結合蛋白である観点からを研究した。また *in vivo* での GRP78 knockdown による放射線感受性増感効果測定を行った。

#### 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 5 件)

Image Fusion for Radiosurgery, Neurosurgery and Hypofractionated Radiotherapy.

Inoue HK, Nakajima A, Sato H, Noda SE, Saitoh J, Suzuki Y. Cureus. 査読有 2015 Mar 2;7(3):e252. doi: 10.7759/cureus.252.

Topics in chemotherapy, molecular-targeted therapy, and immunotherapy for newly-diagnosed glioblastoma multiforme. Okonogi N, Shirai K, Oike T, Murata K, Noda SE, Suzuki Y, Nakano T. Anticancer Res. 査読有 2015 Mar;35(3):1229-35.

Radiotherapy-induced anti-tumor immunity contributes to the therapeutic efficacy of irradiation and can be augmented by CTLA-4 blockade in a mouse model. Yoshimoto Y, Suzuki Y, Mimura K, Ando K, Oike T, Sato H, Okonogi N, Maruyama T, Izawa S, Noda SE, Fujii H, Kono K, Nakano T. PLoS One. 査読有 2014 Mar 31;9(3):e92572. doi: 10.1371/journal.pone.0092572.

Comparison of the radiosensitivities of neurons and glial cells derived from the same rat brain.

Kudo S, Suzuki Y, Noda SE, Mizui T, Shirai K, Okamoto M, Kaminuma T, Yoshida Y, Shirao T, Nakano T. Exp Ther Med. 査読有 2014 Sep;8(3):754-758. Epub 2014 Jun 23.

Optimal hypofractionated conformal radiotherapy for large brain metastases in patients with high risk factors: a single-institutional prospective study. Inoue HK, Sato H, Suzuki Y, Saitoh J, Noda SE, Seto K, Torikai K, Sakurai H, Nakano T. Radiat Oncol. 2014 査読有;9:231. doi: 10.1186/s13014-014-0231-5.

[学会発表](計 0 件)

[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]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

野田 真永(NODA, Shin-ei)  
群馬大学医学部附属病院・講師  
研究者番号: 60396645

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：