

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462273

研究課題名(和文) 膜透過性ペプチドを用いた悪性神経膠腫腫瘍幹細胞に対する治療の実現化の研究

研究課題名(英文) The study to construct a new therapy for malignant glioma stem cell using a cell penetrating peptide

研究代表者

中村 英夫 (Nakamura, Hideo)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30359963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫のグリオーマ幹細胞(GSC)の存在が化学療法や放射線治療抵抗性の原因であると考え、それに対する膜透過性ペプチドをもちいた治療を実現すべく、薬剤内包ミセルを用いた実験を構築した。ターゲットとするGSCは手術検体より得られた腫瘍細胞を直接ヌードマウスの皮下に植え込み、樹立した。培養実験や動物実験にて膜透過性ペプチドによる腫瘍細胞の細胞死を観察し、それがオートファジーによるものであることを確認した。さらなる動物実験が必要と考えている。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is resistant to chemotherapy and radiation therapy. Therefore, to overcome this resistancy, we planned the experiment using cell-penetrating peptide. This peptide were wrapped by a Micelle to be delivered the tumor cells in vivo. Glioma Stem Cell (GSC) were established from surgical samples and as soon as possible they were injected to nude mice. Autophagy was observed by several experiments using this cell-penetrating peptide. We need more animal experiments to testify these phenomenon.

研究分野：Brain tumor biology

キーワード：Glioma Stem cell penetrating peptuide autophagy micelle

1. 研究開始当初の背景

(1) グリオーマ幹細胞の存在

悪性神経膠腫は予後不良な疾患である理由として、浸潤性の腫瘍であるために手術にて全摘出できないことと、残存した腫瘍細胞が化学療法や放射線治療などの genotoxic な治療に抵抗性であることがあげられる。つまり化学療法や放射線治療に対する感受性が低い細胞があり、これがグリオーマ幹細胞だと考えられている。グリオーマ幹細胞は未分化な状態で細胞周期の回転が遅いために、化学療法や放射線治療中は死滅することなしに残存し、その後腫瘍細胞として分裂していく。つまりこのグリオーマ幹細胞を死滅させる効果的な方法が悪性神経膠腫の新たな治療法として必要であると考えられている。

(2) グリオーマ幹細胞をターゲットにした治療法の考案

従来化学療法や放射線治療に感受性の低いグリオーマ幹細胞に対して、我々はグリオーマ幹細胞を特異的に攻撃する全く新規の治療法を考案した。グリオーマ幹細胞に細胞膜透過性ペプチドを導入して、腫瘍細胞の増殖抑制やアポトーシス、オートファジーなどの細胞死を誘導する方法であるが、この細胞膜透過性ペプチドとして p53 蛋白のカルボキシル基(C末端)を用いた。というのは、腫瘍抑制遺伝子である p53 の C末端ペプチドを p53 が変異している腫瘍細胞に導入すると細胞増殖が抑制されるということは報告されていた。

(3) 薬剤内包ミセルの応用

グリオーマ幹細胞に対して細胞膜透過性ペプチドを導入するという方法は効果的であるが、グリオーマ組織に細胞膜透過性ペプチドを単に投与しても、おそらく多数存在する腫瘍細胞のなかでグリオーマ幹細胞に対して細胞膜透過性ペプチドを特異的に導入することは困難である。そこで我々は

薬剤内包ミセルの中に膜透過性ペプチドを内包させ、ミセルの表面にグリオーマ幹細胞に親和性の高い抗体を付着させる方法を考案した。

2. 研究の目的

(1) 細胞膜透過性ペプチドの有効性と細胞死のメカニズムの検討

最終的な研究の目的はグリオーマ幹細胞をターゲットにする治療法の開発であるが、細胞膜透過性ペプチドによる細胞死誘導のメカニズムを解明する必要があると考えた。我々は、この細胞死がオートファジーによるものであると報告しているが、そのメカニズムを分子生物学的に検証することを第一の目的とした。

(2) 薬剤内包ミセルのグリオーマ幹細胞に対する特異性の検証

理論的にはグリオーマ幹細胞に特異的な抗体をミセルの表面に付着させることによって、グリオーマ幹細胞への選択性が高まることが予想されるが、それについて検証する必要がある。グリオーマ幹細胞に対する特異的抗体に関しては最もグリオーマ幹細胞に対して親和性の高い抗体を選択する予定であるが、どれくらいの特異性が認められるかの検証を第二の目的とした。

(3) 膜透過性ペプチド内包ミセルのグリオーマ幹細胞に対する細胞死誘導の検証

実際に、膜透過性ペプチド内包ミセルがグリオーマ幹細胞特異的に分布し、さらにグリオーマ幹細胞に細胞死を誘導できるかを観察できるかが最も重要な所見であり、第3の目的とした。これらが検証できれば、それから動物実験などに応用していくことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膜透過性ペプチドの構築

腫瘍抑制遺伝子である p53 の C末端ペプチドを p53 が変異している腫瘍細胞に導入す

ると細胞増殖が抑制されるということは報告されていた。また、フロックスハウスウイルス (FHV) 由来の塩基性ペプチドが細胞内導入効率の高いことが明らかになっていた(引用文献1)。まず、われわれは、このペプチドが最も効率性の高いものかどうかの検証と、さらに効率性が高いペプチドの検索をおこなう(図1)。アミノ酸塩基を



(図1) PAS-FHV-p53C'の構造

変換することで細胞内への導入効率の変化をモニタリングしたが、細胞はいくつかのグリオーマの細胞株を使用する。

(2) グリオーマ幹細胞特異的抗体の選択
グリオーマ幹細胞を特異的に認識する抗体として CD133 というものを膜透過性ペプチド内包ミセルに付着させる。また CD133 以外のグリオーマ幹細胞を認識できる抗体として CD44、SOX2、OCT4 などを選択し、グリオーマ幹細胞を認識できる特異性を評価する。

(3) 膜透過性ペプチドのオートファジー細胞死誘導のメカニズムの解明

Pas (penetration accelerating sequence; FFLIPKG というペプチド配列)が膜透過型ペプチドの作用を増強するメカニズムはマクロピノソーム膜を断裂することによると考えられていることや、電子顕微鏡での観察結果から膜透過型 p53C' 末端ペプチドや Pas-FHV はグリオーマ幹細胞内で誘導されたオートファゴソームの膜を断裂することによって、リソソームとの融合を阻害していることが推察されている。その結果オートファゴソームが細胞質内に蓄積して、オートファジー細胞死を誘導していると我々は考えている。オートファジーといっ

ても多くの細胞内シグナル分子が関与しており、これら一連のメカニズムを分子生物学的にある程度検証する。

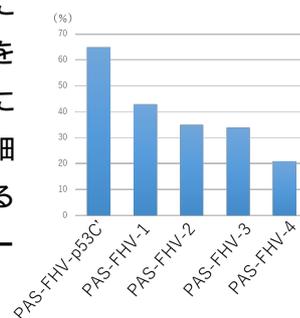
(4) グリオーマ幹細胞に対しての特異的抗体を付着させた膜透過性ペプチド内包ミセルの有効性の検証

最終的に構築した膜透過性ペプチドを内包したミセルがグリオーマ幹細胞に特異的に細胞死を誘導できるかを検証する。またグリオーマを移植したヌードマウスに対しての有効性を検証する。

4. 研究成果

膜透過性ペプチドに関してはいくつか試みたが、最終的には図1に示す PAS-FHV-p53C' が最も効率よく細胞死を誘導できることが検証された(図2)。他のペプチドに関してはある程度細胞死を誘導できるものの、PAS-FHV-p53C' を越えて誘導できるものはなかった。PAS-FHV-p53C'

を以後の実験に使用することを決定した。次にグリオーマ幹細胞を認識できる抗体のスクリーニングを行



(図2) 各ペプチドによる細胞死誘導率

い、最も特異

性の高いものを探索した。候補として CD44、SOX2、OCT4 などを考慮していた。まず、グリオーマ幹細胞に関しては手術によって得られたグリオーマ細胞を幹細胞を培養できる培地にて培養していたが、幹細胞の発育が悪く、なかなか十分な幹細胞を得ることができなかった。そこで我々は、手術にて得られた臨床検体をホモジネイトしてダイレクトにヌードマウスの皮下に移植するという方法をおこなった。このようにすることで、腫瘍の発育が早く、実験に使用できる十分な幹細胞を得ることができた。この細胞を使って、膜透過性ペプチド

による細胞死の実験を繰り返した。細胞死のメカニズムとしてオートファジーの指標である LC3 が細胞質内に認められ、また LC3-II が細胞内で増加していることも確認できた。またアポトーシスの可能性も考え、DNA の fragmentation などの実験もおこなったが、アポトーシスを示唆するデータは得られなかった。グリオーマ幹細胞を特異的に認識する抗体をスクリーニングしたところ、CD133 より高率に幹細胞を認識できるものがなかった。ただし、CD133 が特異性が高くグリオーマ幹細胞を認識できるかということ、そうでもなくグリオーマ細胞もある程度認識することが判明した。そこで現在も CD133 以外の特異性の高い抗体をスクリーニングしており、探索中である。動物実験に関しては、膜透過性ペプチド内包ミセルがグリオーマ幹細胞を移植したヌードマウスに対してどれだけ効果があるかを検証したかったが膜透過性ペプチド内包ミセルがまだ完成しておらず、そこまでの実験ができなかった。しかし、グリオーマ幹細胞を移植したヌードマウスのモデルはできあがっており、今後の実験に応用可能である。研究成果としてはまだまだ満足できる結果ではないが、今後も結果がでるまで実験遂行予定である。

引用文献

- 1) Ueda Y, Wei FY, Hide T, Michiue H, Takayama K, Kaitsuka T, Nakamura H, Makino K, Kuratsu J, Futaki S, Tomizawa K. Induction of autophagic cell death of glioma-initiating cells by cell-penetrating D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus. *Biomaterials*. 2012 ; 33 : 9061-9.

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 3 件)

秀拓一郎 牧野敬史 中村英夫 矢野茂敏 特集：がん幹細胞 脳腫瘍のがん幹細胞、*日本臨床*、査読無、73 巻、2015、pp 836-843

<http://www.nippon-rinsho.co.jp/>

中村英夫 倉津純一 悪性グリオーマの遺伝子染色体異常と臨床の予後、癌と化学療法、41 巻、2014、pp 713-719,

<http://ccpgan.com/>

Takahashi Y, Makino K, Nakamura H, Hide T, Yano S, Kamada H, Kuratsu J. Clinical characteristics and pathogenesis of cerebellar glioblastoma. *Mol Med Rep*. 2014 ; 10 : 2383-88

DOI:10.3892/mmr.2014.2549

(学会発表)(計 4 件)

Nakamura H. Makino K. Kuroda J. Shinojima N. Kuratsu J. Malignant transformation in oligodendroglioma with 1p19q LOH : 21th International Conference on Brain Tumor Research Therapy (Apr. 10-13, 2016, Bankoku Shinryokan, Okinawa)

Nakamura H. Makino K. Kuroda J. Shinojima N. Yano S. Genetic Analysis of malignant transformation in Oligodendroglioma with 1p19q LOH : 13th Asian Society of Neuro-Oncology Meeting (Sep. 11-15, 2016, Veneu-Sheraton on the Park, Sydney, Australia)

Nakamura H. Makino K. Kuroda J. Shinojima N. Yano S. Secondary Glioblastoma in the patients with intracranial germ cell tumors with chemotherapy and radiotherapy : 44th International symposium of Pediatric

Neurosurgery (Oct. 23-27, 2016, KOBE
PORTPIA HOTEL, Kobe)

中村英夫 牧野敬史 黒田順一郎 毛
様細胞性星細胞腫患者の長期的な治療成績
と QOL 第 44 回日本小児脳神経外科学会
(2016)

〔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

中村英夫 (NAKAMURA, Hideo)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30359963

(2)研究分担者

牧野敬史 (MAKINO, Keishi)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90381011

秀拓一郎 (HIDE, Takuichiro)
熊本大学・医学部附属病院・診療講師
研究者番号：40421820

黒田順一郎 (KURODA, Jun-ichiro)
熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：90536731

研究分担者

倉津純一 (KURATSU, Jun-ichi)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号：20145296

研究分担者

荒木令江 (ARAKI, Norie)
熊本大学・生命科学研究部・准教授
研究者番号：80253722

(3)連携研究者

富澤一仁 (TOMIZAWA, Kazuhito)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号：40274287

(4)研究協力者

()