

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861263

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞に対するNotch阻害剤の効果解析と前臨床試験

研究課題名(英文) The effect of the Notch inhibitor and a preclinical study for glioma stem cells

研究代表者

田中 慎吾 (Tanaka, Shingo)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：40507084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は予後不良な悪性脳腫瘍であり、膠芽腫幹細胞に対する治療が再発予防や根治性の向上に重要とされている。本研究では、9種類の膠芽腫患者由来膠芽腫幹細胞に対しNotch阻害剤MRK-003の有効性を評価した。MRK-003は全ての膠芽腫幹細胞に対し、細胞増殖抑制、アポトーシス促進、幹細胞形質抑制の効果を示した。使用した膠芽腫幹細胞は高感受性群と低感受性群に分けられた。IC50(50%阻害濃度)はCD44の発現量と負の相関関係、CD133の発現量と正の相関関係を認めた。MRK-003はCD44高値、CD133低値の膠芽腫幹細胞に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is the most malignant primary brain tumor in humans. The patients with glioblastoma have a uniformly poor prognosis. The significance of targeting glioblastoma-initiating cells (GICs) may be important for successful treatment of glioblastoma. In this study, we analyzed the effect of the Notch inhibitor MRK-003 on nine patient-derived GICs. MRK-003 suppressed GIC's proliferation and stemness maintenance, and promoted their apoptosis. Based on their sensitivities to MRK-003, the nine GICs were divided into "relatively sensitive" and "relatively resistant" GICs. The IC50(half maximal inhibitory concentration) of MRK003 in a set of GICs exhibited a negative correlation with CD44 and positive correlation with CD133. Our study suggested that MRK-003 may exhibit significant therapeutic potential for GICs with CD44-high and CD133-low expression.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 MRK-003 Notch阻害剤 グリオーマ幹細胞

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性かつ制御困難な腫瘍である。腫瘍摘出術に加え放射線化学療法を施行しても生存期間は2年未満のことが多い。昨今の医療進歩による他臓器癌治療成績の改善を鑑みると、過去30年にわたり治療成績がほぼ不変である膠芽腫に対して新たな治療法の確立は最重要課題である。膠芽腫は正常脳組織へ浸潤して増大していく特徴があるため他臓器固形癌と異なり外科的完全切除は不可能である。そのため外科的切除後の残存腫瘍制御のために新たな化学療法の確立が必須である。

近年のがん基礎研究では腫瘍の起源となる癌幹細胞の存在が提唱され、脳腫瘍においてもグリオーマ幹細胞がいち早く同定され、研究領域が急速に拡大している。

我々は正常幹細胞および癌幹細胞に重要とされる Notch シグナルに着目した。Notch シグナルとは、細胞間同士のシグナル伝達経路である。Notch の下流シグナルには細胞の生存、増殖に関与する AKT 経路を含め他の様々なシグナル経路が関連しているとされる。グリオーマ幹細胞に対する機能として腫瘍幹細胞の形質維持、細胞増殖、アポトーシス制御がある。

Notch 阻害剤とは一般に γ -セクレターゼ阻害剤のことを指す。MRK003 は強力な γ -セクレターゼ阻害作用を有する新規の化合物であり、基礎研究において T 細胞性白血病、乳癌、膵臓癌に対して強力な増殖抑制、アポトーシス促進効果が報告され、膵臓癌に対しては現在米国で臨床応用が検討されている。しかしながらグリオーマ幹細胞に対する MRK003 の効果解析はまったくなされていない。

従って、グリオーマ幹細胞を含めた癌幹細胞の形質維持、増殖、アポトーシス制御に重要な Notch シグナルに着目し、未開拓であるグリオーマ幹細胞に対する強力な γ -セクレターゼ阻害剤の効果を解析するプロジェクトを立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膠芽腫幹細胞を用いて γ -セクレターゼ阻害剤 MRK003 の有効性を評価し膠芽腫に対する新たな分子標的療法の基礎基盤を構築することにある。

3. 研究の方法

本研究で使用する膠芽腫幹細胞は、膠芽腫患者由来であり、幹細胞形質が既に確認されている9種類の膠芽腫幹細胞である。

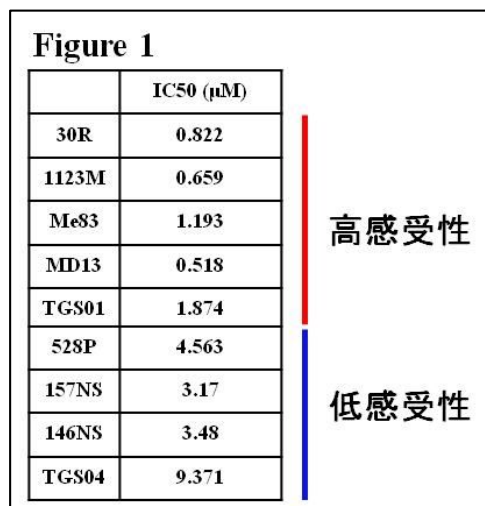
患者由来膠芽腫幹細胞に MRK003 を種々の濃度で添加し細胞増殖抑制程度を解析し個々の膠芽腫幹細胞に対する IC50 (50%阻害濃度) を評価した。次に膠芽腫幹細胞が形成する sphere 形成能およびアポトーシスへの影響を評価した。MRK003 によって、Notch の下流シグナルかつ膠芽腫の主要な増殖シグナルである AKT シグナルの変化を蛋白レベルで解析した。癌幹細胞病変マーカーである CD44 と CD133 の発現レベルを評価し、IC50 との相関関係を解析した。

4. 研究成果

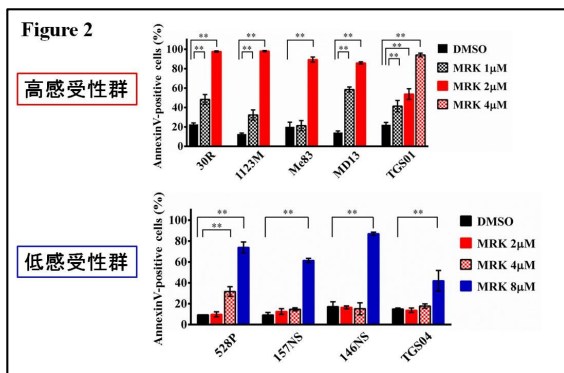
患者由来膠芽腫幹細胞と Notch 阻害剤 MRK003 の解析を行うことにより下記の3点を明らかにした。

(1) 9種類 (30R, 1123M, Me83, MD13, 528P, 157NS, 146NS, TGS01, TGS04) の患者由来膠芽腫幹細胞を MRK003 で処理すると濃度依存性に細胞増殖抑制、アポトーシス促進、幹細胞形質の抑制が認められた。また MRK003 に対する感受性は、高感受性群と低感受性群に分けられた。

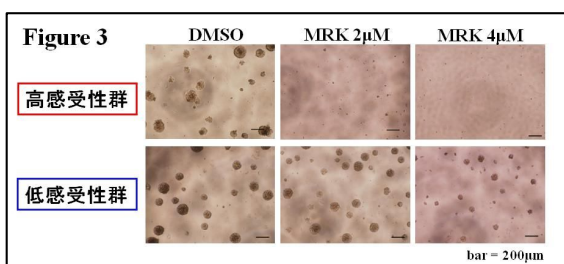
MRK003 は細胞増殖を抑制した。IC50 の結果から2群に分けられた。(Figure 1)



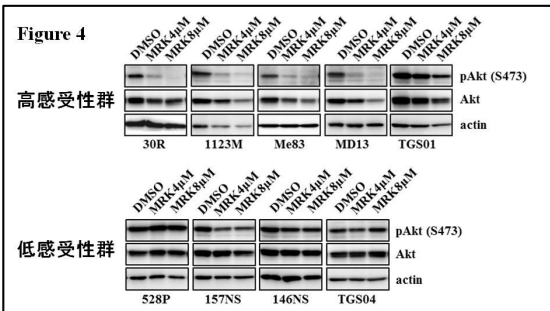
MRK003 は全膠芽腫幹細胞に対しアポトーシスを促進した。高感受性群は、4 μ M 以下でアポトーシス細胞が著明に増加するのに対し、低感受性群は8 μ M でアポトーシス細胞の著明な増加を認めた。(Figure 2)



MRK003 により全膠芽腫幹細胞は Sphere 数および大きさの減少を認めた。高感受性群は MRK 低濃度、低感受性群は高濃度で強い効果であった。(Figure 3)

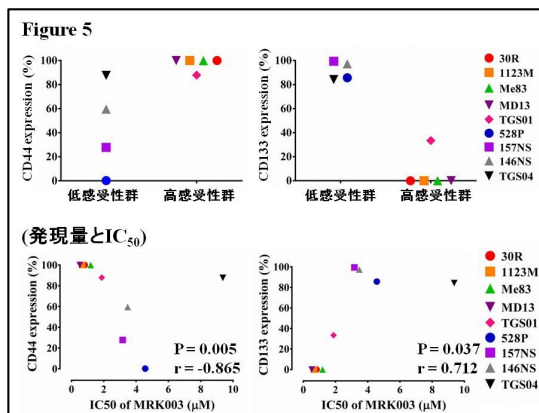


(2) MRK003 処理後の Akt リン酸化レベルについて、高感受性群は MRK003 によってリン酸化 Akt の発現が強く低下しているのに対し低感受性群のリン酸化 Akt の低下はわずかしが認められなかった。(Figure 4)

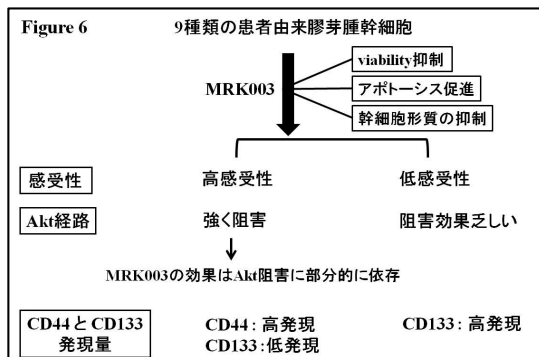


MRK003 の効果が Akt 阻害程度に依存しているかどうか Akt 過剰発現モデルを作成し解析をした。その結果、MRK003 の効果は Akt 経路の阻害程度に一部依存していた。

(3) 高感受性群では CD44 が高く、CD133 が低い発現量を呈していたのに対し低感受性群では、CD133 が高発現を呈した。CD44 および CD133 の発現量と IC50 との相関関係は、CD44 は負の相関、CD133 は正の相関関係を呈していた。(Figure 5)



以上のことから、 γ -セクレターゼ阻害剤 MRK003 は、患者由来グリオーマ幹細胞に対し細胞増殖抑制、アポトーシス促進、幹細胞形質維持の抑制を示した。そのメカニズムとして Akt シグナル阻害が部分的に関与していると考えられた。MRK003 は CD44 の発現量が高く、CD133 の発現量が低い膠芽腫幹細胞に有効であることが示唆された。(Figure 6)



近年、がん幹細胞を標的とする新たな治療法の確立が重要とされている。Notch シグナル阻害により、膠芽腫幹細胞を制御することで新たな治療につながる可能性があると考えられる。今後は、動物実験における MRK003 の効果を解析し MRK003 の臨床応用への可能性を探る予定である。

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. Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MA, Hayashi Y, Hamada J, Hirao A Strong therapeutic potential of γ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells *J Neurooncol.* Oct 8. [Epub ahead of

- print] 2014 (査読有り)
doi:10.1007/s11060-014-1630-z
2. Nakada M, Tanaka S, Oishi M, Miyashita K, Misaki K, Mohri M, Hayashi Ya, Uchiyama N, Watanabe T, Hayashi Yu.
Cerebral infarction related to carmustine wafers in glioblastoma.
Neurol Med Chir (Tokyo) 2014 (査読有り) doi :10.2176/nmccrj.2014-0080
 3. Tanaka S, Nakada M, Nobusawa S, Suzuki SO, Sabit H, Miyashita K, Hayashi Y.
Epithelioid glioblastoma arising from pleomorphic xanthoastrocytoma with the BRAF V600E mutation.
Brain Tumor Pathol. 2014;31:172-6. (査読有り) doi:10.1007/s10014-014-0192-2
 4. Yamada D, Hoshii T, Tanaka S, Hegazy AM, Kobayashi M, Tadokoro Y, Ohta K, Ueno M, Ali MA, Hirao A.
Loss of Tsc1 accelerates malignant gliomagenesis when combined with oncogenic signals.
J Biochem. 2014;155:227-33. (査読有り) doi: 10.1093/jb/mvt112
- [学会発表](計8件)
1. 田中慎吾, 中田光俊, 大石正博, 内山尚之, 池田博子, 林裕
右頭頂葉出血で発症した小児脳腫瘍の1例
第32回脳腫瘍病理学会, 平成26年5月23日-24日, 徳島 あわぎんホール
 2. 田中慎吾, 中田光俊, 山田大祐, 中野伊知郎, 藤堂具紀, 稲生靖, 林裕, 濱田潤一郎, 平尾敦
Mesenchymal type GBM に対する Notch 阻害剤の有効性
第31回日本脳腫瘍学会 平成25年12月8日-10日, フェニックス・シーガイア・リゾート・宮崎
 3. Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Hayashi Yu, Hamada JI, Hirao A
Strong therapeutic potential of γ -secretase inhibitor MRK003 for GBM stem-like cells with high CD44 and low CD133 expression
4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology
November 21-24, 2013, San Francisco
 4. 田中慎吾, 中田光俊, 山田大祐, 中野伊知郎, 稲生靖, 藤堂具紀, 林裕, 濱田潤一郎, 平尾敦
Notch 阻害による膠芽腫幹細胞の制御
第14回日本分子脳神経外科学会 平成25年10月18日-19日, パシフィコ横浜
 5. 田中慎吾, 中田光俊, 中野伊知郎, 藤堂具紀, 稲生靖, 林裕, 濱田潤一郎, 平尾敦
膠芽腫幹細胞株に対する γ -セクレターゼ阻害剤 MRK003 の効果
第72回日本脳神経外科学会総会 平成25年10月16日-18日, パシフィコ横浜
 6. 田中慎吾, 中田光俊, 信澤純人, 宮下勝吉, 林裕, 濱田潤一郎
Pleomorphic xanthoastrocytoma から epithelioid glioblastoma へ悪性転化した1例
第85回日本脳神経外科学会中部支部学術集会, 平成25年9月21日, 愛知医科大学
 7. 田中慎吾, 中田光俊, 宮下勝吉, 林裕, 佐々木素子, 濱田潤一郎
初回手術13年後に急速増大した若年左側頭葉再発腫瘍の1例
第31回脳腫瘍病理学会, 平成25年5月24日-25日, 東京 KFC Hall 国際ファッションセンター
 8. 田中慎吾, 中田光俊, 宮下勝吉, 林裕, 濱田潤一郎
肉眼的全摘出13年後に悪性転化し急

激な転帰をとった pleomorphic
xanthoastrocytoma の 1 例
第 84 回日本脳神経外科学会中部支部学
術集会, 平成 25 年 4 月 20 日、三重ホテ
ルグリーンパーク津

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 慎吾 (TANAKA SHINGO)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：40507084

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし