

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461899

研究課題名(和文) ヒト癌幹細胞に対する IFN- α 賦活 BID 遺伝子/放射線集学的治療の検討

研究課題名(英文) Assessment of IFN-alpha activated BID gene/radiation combined modality therapy for human cancer stem cells

研究代表者

津野 隆哉 (Tsunno, Takaya)

高知大学・医学部・研究員

研究者番号：60598259

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)：アポトーシスを誘導する BID 遺伝子を発現するレトロウィルスベクター及びコントロールベクターを作成し、これらをヒト神経膠芽腫幹細胞株 (MD13) に *in vitro* で感染導入した。次いでヌードマウス脳内にこれら MD13 を移植後、PEG-IFN- α を 4 回 (1 回/週) 皮下注射した。その結果、BID+IFN で生存期間の有意な延長を得た。これらの脳検体で免疫染色を行うと、BID+IFN で BCL2 (アポトーシスを抑制) 発現が抑制され、AIF の核内発現 (アポトーシスを誘導) が増加していた。このように BID+IFN は神経膠芽腫幹細胞に対しても *in vivo* で抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：BID functions in the mitochondrial apoptotic pathway. We constructed the BID gene vector using a retro-viral vector, including a control one. The retro-viral vectors were transfected into a human glioblastoma stem cells, which are called as MD13. The MD13 cells were then inoculated into the brains of nude mice. The nude mice were treated with PEG-IFN- α or saline, which was subcutaneously and weekly injected 4 times. As a result, BID+IFN significantly prolonged overall survival. The immunohistochemistry using the brain specimens revealed underexpression of BCL2, which suppresses apoptosis, and overexpression of AIF in the nuclei, which are induced by apoptosis. These results suggest that BID+IFN demonstrated anti-tumor effects even against glioblastoma stem cells *in vivo*.

研究分野：細胞死

キーワード：IFN- α BID apoptosis

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する新たな治療戦略として、我々は interferon (IFN)- α による細胞質内 BH3 interacting-domain death agonist (BID) を介するミトコンドリアアポトーシスに着目し、in vitro にてその有用性を示した (Tsuno T, et al, 2012)。次いで、IFN- α /放射線治療抵抗性ヒト肺癌細胞株皮下接種マウスを用いて、IFN- α 賦活化 BID 遺伝子/放射線集学的療法 (BID+IFN+RT) を in vivo で評価した。その結果、BID+IFN+RT 群にて腫瘍体積の増大抑制を認めた。また同群では、免疫組織染色法にて BID 蛋白の核内局在率の減少を認め、更に電子顕微鏡所見としてミトコンドリアアポトーシスを認めた。このように in vivo でも同集学的療法の有用性が示唆された。

2. 研究の目的

上記の in vivo 結果は cell line 化された肺癌細胞株 A549 を異所性にヌードマウス皮下に移植して得られた自験例である。これらの結果より本研究では、cancer stem cells を用いて同所性移植下での抗腫瘍効果を検討した。具体的には、実際のヒト脳腫瘍患者より得られた腫瘍幹細胞株をヌードマウス脳内に移植して、抗腫瘍効果を検討した。

3. 研究の方法

まず、関西医科大学脳神経外科学講座所有のヒト神経膠芽腫幹細胞株 (MD13; オハイオ大学より提供) をヌードマウス脳内に移植した。次いで、これまでの自験例で使用した BID 遺伝子含有プラスミドベクター及びコントロールベクター (mock) を、脳内移植後のヌードマウスに尾静脈注射した。続いて、生体内で消失半減期の長い pegylated interferon (PEG-IFN)- α 及び placebo (生理食塩水) を 4 回 (1 回/week) をヌードマウスに皮下注射し、BID 遺伝子治療に対する IFN- α 感受性を in vivo で検討した (Mock+saline, Mock+IFN, BID+saline, BID+IFN の 4 群, 各 n = 6)。次に、BID 遺伝子を発現するレトロウイルスベクター及びコントロールベクター (mock) を作成した。これらのベクターを上記の MD13 に in vitro で感染後遺伝子導入し、BID 過剰発現ヒト神経膠芽腫幹細胞株とその mock 幹細胞株を作成した。ヌードマウス脳内にこれらの幹細胞株を移植した。次いで、PEG-IFN- α 及び placebo (生理食塩水) を 4 回 (1 回/week)、ヌードマウスに皮下注射し、BID

遺伝子治療に対する IFN- α 感受性を in vivo で検討した (Mock+saline, Mock+IFN, BID+saline, BID+IFN の 4 群, 各 n = 6)。

尚、上記治療に更に放射線治療を加えることによって生じる実験結果の解釈の困難化を避けるため、放射線治療は加えなかった。

4. 研究成果

1) MD13 をヌードマウス脳内に移植後、安定的に生着させることに成功した。

2) それら脳内移植後のヌードマウスの尾静脈に BID 遺伝子含有プラスミドベクターを注射後、上記のように PEG-IFN- α による治療を施行した。しかし、その治療群においても生存期間の有意な延長を得ることはできなかった。原因として、プラスミドベクター静脈注射後の生体内におけるベクターの不安定性の問題や、プラスミドベクター静脈注射による脳内移植後の MD13 への遺伝子導入効率の問題が考えられた。

3) 以上より、MD13 を脳内に移植前に、in vitro にて MD13 へ BID 遺伝子を導入することとした。導入効率をより確実とするため、今回はプラスミドベクターでなく、レトロウイルスベクターを用いることとした。

4) MD13 に in vitro で感染後遺伝子導入し、BID 過剰発現 MD13 とその mock-MD13 を作成することに成功した。次いで、それら遺伝子導入後 MD13 をヌードマウス脳内に移植後、安定的に生着させることに成功した。

5) これらのヌードマウスに上記のように PEG-IFN- α 治療を施行した。その結果、生存期間解析として Kaplan-Meier 法により log-rank 検定を行うと、BID+IFN で生存期間の有意な延長が見られた ($p = 0.0251$, 図 1)。

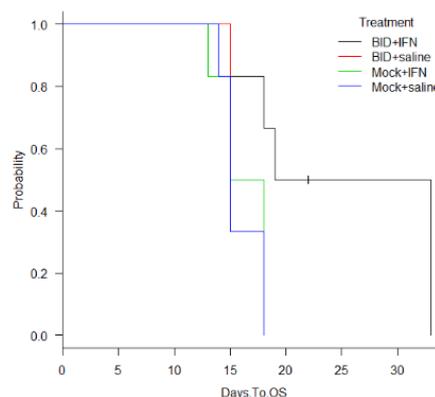


図 1. 各治療群における生存曲線 (log-rank 検定; $p = 0.0251$)

6) 次いで、これら各治療群の脳検体を用いて、アポトーシスに関する蛋白質発現を免疫染色法にて検討した。B-cell lymphoma 2 (BCL2; アポトーシス抑制に関与)発現が、**BID+IFN** で他の治療に比し抑制されていた (図2)。

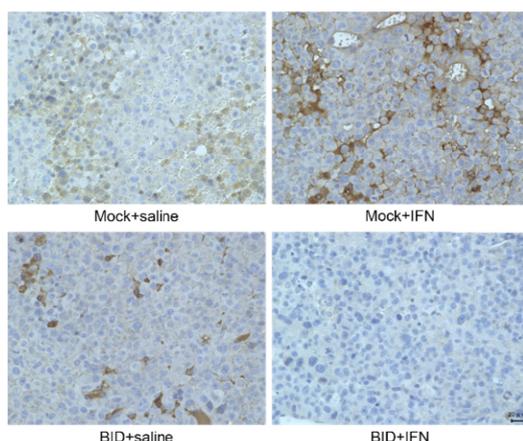


図2. BCL2発現; BID+IFNで発現抑制を認めた (何れも 40 倍視野, 等尺拡大); BID+IFN では染色細胞をほぼ認めない。

7) また免疫染色法にて、Apoptosis Inducing Factor (AIF; アポトーシスによりミトコンドリアから核内へ移行)発現が、**BID+IFN** で他の治療に比し核で増加していた (図3)。

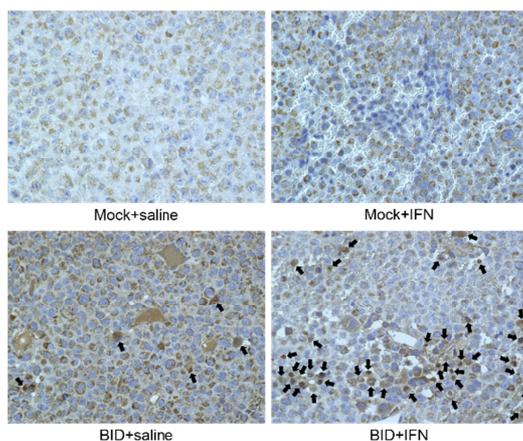


図3. AIF発現; BID+IFNで核に多く発現を認めた (何れも 40 倍視野, 等尺拡大); BID+IFN では核染色 (黒矢印)を多く認めるが、その他の治療では核染色が明瞭に少なく、細胞質染色が不染色を認める。

8) 以上より、**BID 遺伝子/IFN-α** 併用療法で、アポトーシスが誘導されることにより、抗腫瘍効果を発する機序が *in vivo* でも考えられた。我々は以前、*in vitro* に於ける **BID 遺伝子**

/IFN-α 併用療法でアポトーシスが誘導されることを報告している (Tsuno T, et al. 2012)が、今回の *in vivo* での結果も、以前の *in vitro* での結果と矛盾しないと考えられた。このように、**BID 遺伝子/IFN-α** 併用療法により *in vivo* でも抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。

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 20 件)

- 1) Gamoh S, Tsuno T, Akiyama H, et al. Intracranial meningeal melanocytoma diagnosed by an interdisciplinary approach: a case report and review of the literature. J Med Case Rep. 2018 in press. (査読有)
- 2) 岩田亮一, 丸山正人, 大舟晃平, 他. 転移性脳腫瘍とがん幹細胞の関連. Cytometry Research 28: 13-18, 2018. (査読無) https://doi.org/10.18947/cytometryresearch.28.1_13
- 3) Ohta T, Okada K, Fukuda M, Masahira N, Matsuoka T, Tsuno T, Takemura M. Safety and Efficacy of Intravenous Low-Dose Alteplase in Relative Contraindication Patients with Acute Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2018;27:1844-1851. (査読有) doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.02.026
- 4) Ohta T, Morimoto M, Okada K, Fukuda M, Onishi H, Masahira N, Matsuoka T, Tsuno T, Takemura M. Mechanical Thrombectomy in Anterior Circulation Occlusion Could Be More Effective than Medical Management Even in Low DWI-ASPECTS Patients. Neurol Med Chir (Tokyo). 2018;58:156-163. (査読有) doi: 10.2176/nmc.0a.2017-0203
- 5) Kamei T, Nonaka M, Uemura Y, Yamanouchi Y, Komori Y, Iwata R, et al. Enlarging pediatric ectopic Rathke's cleft cyst in the prepontine cistern: case report. J Neurosurg Pediatr. 2017;20:480-484. (査読有) doi: 10.3171/2017.6.PEDS1727
- 6) Takeda J, Nonaka M, Li Y, Komori Y, Kamei T, Iwata R, et al. 5-ALA fluorescence-guided endoscopic surgery for mixed germ cell tumors. J Neurooncol. 2017;134:119-124. (査読有) doi: 10.1007/s11060-017-2494-9
- 7) Iwata R, Maruyama M, Ito T, et al. Establishment of a tumor sphere cell line from a metastatic brain neuroendocrine tumor. Med Mol Morphol. 2017;50:211-219. (査読

- 有) doi: 10.1007/s00795-017-0160-0
- 8) Iwata R, Yoshimura K, Fujita Y, et al. Application of transpulmonary thermodilution monitoring (PiCCO) in patients with neurogenic pulmonary edema and acute obstructive hydrocephalus due to a central neurocytoma: A case report. *Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management* 2017, 8, 57-59. (査読有) <https://doi.org/10.1016/j.inat.2017.01.014>
 - 9) Iwata R, Yoshimura K, Fujita Y, et al. Hyperperfusion syndrome after clipping of an unruptured aneurysm by transsylvian approach: A Case Report. *Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management*. 2017, 8, 11-13. (査読有) <https://doi.org/10.1016/j.inat.2017.01.010>
 - 10) Higashi Y, Aratake T, Shimizu S, Shimizu T, Nakamura K, Tsuda M, Yawata T, Ueba T, Saito M. Influence of extracellular zinc on M1 microglial activation. *Sci Rep*. 2017;7:43778. (査読有) doi: 10.1038/srep43778
 - 11) Kim SH, Ezhilarasan R, Phillips E, Gallego-Perez D, Sparks A, Taylor D, Ladner K, Furuta T, Sabit H, Chhipa R, Cho JH, Mohyeldin A, Beck S, Kurozumi K, Kuroiwa T, Iwata R, et al. Serine/Threonine Kinase MLK4 Determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NF- κ B-dependent Manner. *Cancer Cell*. 2016;29:201-213. (査読有) doi: 10.1016/j.ccell.2016.01.005
 - 12) Yawata T, Higashi Y, Shimizu T, et al. Brain opioid and nociceptin receptors are involved in regulation of bombesin-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in the rat. *Mol Cell Biochem*. 2016;411:201-211. (査読有) doi: 10.1007/s11010-015-2582-0
 - 13) 治療後長期間生存している悪性視神経膠腫の1例. 藤原望, 中内正志, 正健一郎, 山田晴彦, 最所千晶, 岩田亮一, 他. *臨床眼科*. 2016.70.1473-1478. (査読有) <https://doi.org/10.11477/mf.1410211958>
 - 14) Iwata R, Nakano I, Asai A, et al. Mesenchymal type glioma stem cell express icos ligand and upregulate ICOS+IL-10+ T cells. *Neuro-Oncology* 2015;17:v113-v123. (査読有) <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov217.16>
 - 15) Shimizu T, Tanaka K, Shimizu S, Higashi Y, Yawata T, et al. Possible inhibitory role of endogenous 2-arachidonoylglycerol as an endocannabinoid in (\pm)-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in the rat. *Neuropharmacology*. 2015;95:278-289. (査読有) doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.03.034
 - 16) Nonaka M, Yawata T, Takemura M, et al. Elevated cell invasion in a tumor sphere culture of RSV-M mouse glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015;55:60-70. (査読有) doi: 10.2176/nmc.oa.2014-0067
 - 17) Hashida Y, Taniguchi A, Yawata T, et al. Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. *Infect Agent Cancer*. 2015;10:3. (査読有) doi: 10.1186/1750-9378-10-3
 - 18) Nakamura K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Taniuchi K, Shimizu S, Dimitriadis F, Yawata T, et al. Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenaline secretion and pressor responses in the rat. *Sci Rep*. 2014;4:7248. (査読有) doi: 10.1038/srep07248
 - 19) Higashi Y, Hoshijima M, Yawata T, et al. Suppression of oxidative stress and 5-lipoxygenase activation by edaravone improves depressive-like behavior after concussion. *J Neurotrauma*. 2014;31:1689-1699. (査読有) doi: 10.1089/neu.2014.3331
 - 20) Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yawata T, et al. Possible involvement of brain prostaglandin E2 and prostanoid EP3 receptors in prostaglandin E2 glycerol ester-induced activation of central sympathetic outflow in the rat. *Neuropharmacology*. 2014;82:19-27. (査読有) doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.03.005
- [学会発表](計 10 件)
- 1) Takaya Tsuno, Shohei Kanno, Ryoichi Iwata, et al. New drug repositioning of low-dose PEG-IFN- α in combination with BH3 interacting domain death agonist gene and radiation therapy as a cancer treatment regimen. 2017 年, The American Association for Cancer Research, Tumor Immunology and Immunotherapy Conference
 - 2) 津野隆哉, 他. 原因不明の進行性脳塞栓様病変に対し系統的な全身検索により短期間に鑑別診断し得た一例. 2017 年, 第 19 回中国四国脳卒中研究会
 - 3) 太田剛史, 岡田憲二, 政平訓貴, 福田真紀, 津野隆哉, 他. Improved clinical outcome of

acute anterior circulation cerebral artery occlusion with expanded indication and technical standardization of mechanical thrombectomy. 2017年, 第76回日本脳神経外科総会

- 4) 福田真紀, 太田剛史, 竹村光広, 松岡賢樹, 政平訓貴, 岡田憲二, 津野隆哉. Structuring medical care system to improve efficacy of mechanical thrombectomy. 2017年, 第76回日本脳神経外科総会
- 5) 太田剛史, 森本雅徳, 岡田憲二, 津野隆哉, 他. rt-PA 静注療法および血行再建術の積極的な実施による急性期虚血性脳卒中の臨床転帰改善. 2017年, Stroke 2017
- 6) 森本雅徳, 太田剛史, 岡田憲二, 津野隆哉, 他. 脳出血の部位別出血原因の検討. 2017年, Stroke 2017
- 7) 黒川弘晶, 池田茂樹, 神波雅之, 香西雅介, 広川雄三, 寺澤理香, 森勢里美, 津野隆哉, 他. CT を用いた胃癌局所深達度診断: 病理組織所見との比較. 2016年, 第75回日本医学放射線学会総会
- 8) Ryoichi Iwata, et al. Effect of Temozolomide on Brain Metastasis of neuroendocrine carcinoma. 2016年, The 13th Asian Society for Neuro-oncology (ASNO) Meeting
- 9) 上埜泰寛, 河相吉, 宇都宮啓太, 菅野渉平, 河野由美子, 津野隆哉, 他. 副腎FDG-PET/CT 所見の特徴. 2015年, 第74回日本医学放射線学会総会
- 10) 香西雅介, 黒川弘晶, 池田茂樹, 神波雅之, 広川雄三, 寺澤理香, 森勢里美, 津野隆哉, 他. Gastric carcinoma with lymphoid stroma のCT 所見. 2015年, 第74回日本医学放射線学会総会

〔図書〕(計 6 件)

- 1) 政平訓貴, 太田剛史, 岡田憲二, 福田真紀, 松岡賢樹, 津野隆哉, 他. 神戸宣言, その後: 急性期脳梗塞に対する血管内治療の普及の取り組み 3. 各地方の取り組み 四国地方. メディカルトリビューン. 脳血管内治療. 2018 in press.
- 2) 岩田亮一, 浅井昭雄. 転移性脳腫瘍の治療. 日本臨牀社. 脳腫瘍学 - 基礎研究と臨床研究の進歩 - . 2016;74(7):752-756.
- 3) 八幡俊男, 上羽哲也. 浸潤・転移関連遺伝子 MCAM/CD146. 日本臨床社. 脳腫瘍学 - 基礎研究と臨床研究の進歩 - . 2016;74(7):268-273.
- 4) 米虫敦, 菅野渉平, 鈴木聡史, 左野明, 池田耕土, 宇都宮啓太, 播磨洋子, 狩谷秀治, 中谷幸, 吉田理絵, 河野由美子, 津野隆哉, 米虫節夫, 谷川昇. 吸引型半自動生検針

(ステリカット®)の有用性. メディカルアイ. Rad Fan. 2015;13(9):74-76.

- 5) 岩田亮一, 浅井昭雄. 上衣腫. 日本臨牀社別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.28 神経症候群(第2版) - その他の神経疾患を含めて - . 82-85, 2014.
- 6) 岩田亮一, 他. 退形成性上衣腫. 日本臨牀社. 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.28 神経症候群(第2版) - その他の神経疾患を含めて - . 86-89, 2014.

〔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; 特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

津野 隆哉 (TSUNO, Takaya)
高知大学・医学部・研究員
研究者番号: 60598259

(2)研究分担者

岩田 亮一 (IWATA, Ryoichi)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60580446

八幡 俊男 (YAWATA, Toshio)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・助教

研究者番号: 40380323

(3)連携研究者; 特になし

(4)研究協力者; 特になし