

## 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 4 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791170

研究課題名（和文）神経膠芽腫に対する新規GRP78阻害薬併用放射線療法の開発

研究課題名（英文）GRP78 is a novel target for radiation therapy in malignant glioma

## 研究代表者

野田 真永（NODA SHINEI）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：60396645

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト神経膠芽腫3株をshRNAにより作成したGRP78抑制細胞に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した。

そして、その細胞死のパターンはウェスタンブロットではアポトーシス・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が誘導された。次にフローサイトメーターによりアポトーシス比率を測定した。

続いてテモゾロミド(TMZ)併用X線照射群では上記手法により放射線増感効果を確認した。

GRP78抑制によるDNA2重鎖切断効果の測定するため、コメットアッセイ、 $\gamma$ H2Axアッセイを行った。

## 研究成果の概要（英文）：

Stable knockdown cell lines of GRP78 using lentiviral based sh-RNA transduction were generated in 3 glioblastoma (GBM) cell lines. GBM cell lines were exposed 6 Gy of gamma radiation and subsequently evaluated to determine the extent of double strand DNA damage using comet and gamma-H2Ax assay and the radiosensitivity using colony formation assay and MTS assay. Apoptosis was evaluated using flowcytometry and westernblot assay.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：放射線腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：神経膠芽腫、GRP78、放射線治療

## 1. 研究開始当初の背景

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1)。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2)。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 3)。

これまでの study のように PI3K 経路を抑制するだけでは神経膠芽腫を克服できないことから、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た。

研究代表者らは以前 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 に着目した。

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.

## 2. 研究の目的

1. 神経膠芽腫細胞における GRP78 による放射線抵抗性メカニズムを細胞周期、2 重鎖 DNA 切断、代謝機能、EGFR/PI3K/Akt 経路との関連といった観点から、in vitro および in vivo で検証すること。

2. GRP78 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. 上記に示した検証事項は GRP78 によって保持される細胞質内 Ca<sup>2+</sup>濃度に依存することを確認する。

本研究は short hairpin RNA を用いることによって、GRP78 を特異的に knockdown して初めて GRP78 の放射線抵抗性のメカニズムを解明することになる。また小胞体シャペロン蛋白である GRP78 に対する特異的阻害剤を併用した放射線療法により、難治性腫瘍の代表格である、神経膠芽腫の治療成績の大幅な上昇がもたらされる可能性がある。

## 3. 研究の方法

ヒト神経膠芽腫株 LN18, LN229, U87 を使用する。免疫共沈法により、これらのヒト神経

膠芽腫細胞において GRP78 と PI3Kp85 の結合を測定する。

次にレンチウイルス shRNA プラスミドベクター (SIGMA MISSION, USA) を用いた RNA 干渉により、GRP78 の発現を長期間に抑制できる細胞株を作成する。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、SIGMA MISSION shRNA の 5 種類の粒子の中で最もノックダウン効果の高いものを今後使用する。

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。

次に、これらの神経膠芽腫株に X 線照射後、フローサイトメーターにより照射細胞表面に発現するアネキシン V を計測することでアポトーシス比率を測定する。

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。予備実験では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が誘導された。

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。

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、γH2Ax 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。

4. 研究成果

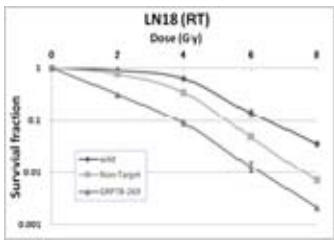


図 a

図 a) 神経膠芽腫 LN18 の GRP78 knockdown 細胞は X 線 6Gy 照射後 84 時間をピークにコントロール細胞に比し、より多くの late apoptosis を引き起こした。

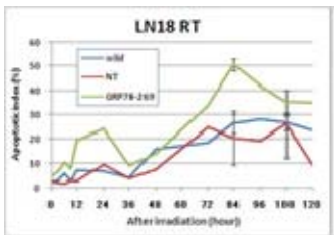


図 b

図 b) 神経膠芽腫 U87 の GRP78 knockdown 細胞は X 線 6Gy 照射後 96 時間をピークにコントロール細胞に比し、より多くの late apoptosis を引き起こした。

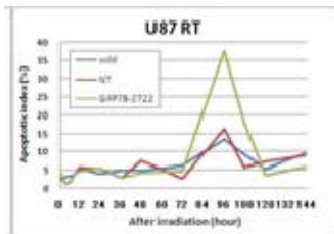


図 c

図 c) コロニーアッセイ；神経膠芽腫 LN18 の GRP78 が約 50% knockdown された細胞は X 線 6Gy 照射により、RBE=1.4 を有した。



図 d) 神経膠芽腫 LN18, U87 の GRP78 knockdown 細胞は X 線 6Gy+TMZ 100uM によって、コントロールに比し、アポトーシスが誘導された。

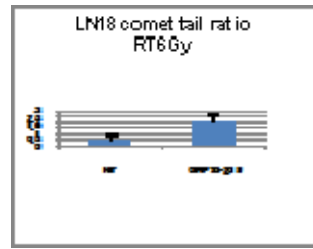


図 e

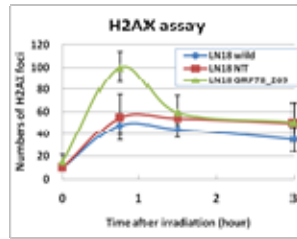


図 f

図 e, f) コメットアッセイおよびγH2Ax アッセイ。神経膠芽腫細胞 LN18 において GRP78 knockdown によって照射後 DNA2 重鎖切断が増加する。

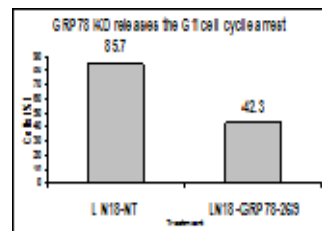


図 g)

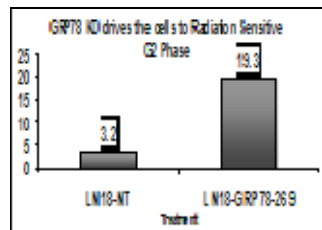


図 h)

図 g, h) 神経膠芽腫細胞 LN18 において GRP78 knockdown によって G1 周期細胞は減少し、細胞は G2/M 期に集積する傾向を認めた。

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 3 件)

① Ohkubo Y, Noda SE, Nakano T. Dose Volume Analysis of Radiotherapy for Inoperable Patients with Stage I-II Endometrial Carcinoma. J Radiat Res. 査読有 52 巻 2011, pp666-73

② Saitoh J, Noda SE, Nakano T. High-dose-rate interstitial brachytherapy with computed

tomography-based treatment planning for patients with locally advanced uterine cervical carcinoma.. J Radiat Res. 査読有 52 巻 2011, pp 490-5

[学会発表] (計 1 件)

①野田真永 リフレッシャーコース(1)子宮頸癌、日本放射線腫瘍学会小線源治療部会第13回研究会 平成 23. 5. 14 (沖縄)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野田 真永 (NODA SHINEI)  
群馬大学・医学部・助教  
研究者番号：6 0 3 9 6 6 4 5

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：