

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592128

研究課題名(和文) iPSC細胞を応用した脳腫瘍モデルに対するREIC遺伝子導入による新規治療法開発

研究課題名(英文) A new therapeutic strategy using adenovirus vector REIC gene in a new glioblastoma (GBM) mice model

研究代表者

影治 照喜 (KAGEJI, Teruyoshi)

徳島大学・大学病院・特任教授

研究者番号：70294684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：慶應義塾大学で確立された浸潤性脳腫瘍モデルを用い、神経幹細胞にレトロウイルスベクターを用いて癌遺伝子を導入したinduced Cancer Stem Cellをwild-typeマウスの脳内に移植、ヒトglioblastomaに近い脳腫瘍形成が可能となり、現在再現性と組織学的評価を実施している。アデノウイルスベクターによる-REIC遺伝子導入で、Wntシグナル上流でのWnt蛋白と受容体の優先的な結合阻害が、下流で働く機能分子の抑制につながることを明らかにし、Cancer Letterに投稿、reviewerに対するresponseを準備、再投稿予定である。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma multiform (GBM) remains incurable despite the use of aggressive and multimodal therapies involving tumor resection, chemotherapy and radiation therapy. The cancer stem cell theory postulates that tumors are sustained by a select cell population with self-renewal ability and the capacity to give rise to a heterogeneous mass of tumor cells. Based on the existence of glioma stem cells for glioblastoma, Saya et al. established the new GBM model. Elsewhere we demonstrated that Dickkopf family3 (DKK3) was down-regulated in GBM cells and that its over-expression drastically inhibited their growth via a caspase-dependent apoptosis. The aim of our study was 1) to establish this model in our institute and 2) to assess the efficacy of Ad-DKK3 in the GBM mice model and 3) to verify the mechanisms underlying the efficacy of DKK3. We partly verified the mechanisms underlying the efficacy by DKK3 in GBM and submitted our paper to Cancer Letter.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 REIC Wntシグナル 薬物排出ポンプ

1. 研究開始当初の背景

近年手術療法、画像診断、化学療法の進歩によりさまざまな悪性腫瘍患者における5年生存率は増加している。しかし悪性神経膠腫、特に最も悪性度の高い膠芽腫(glioblastoma, 以下GBMとする)においては、有効な治療法は無く、この20年間の著明な生存率の改善は得られていないため新たな治療法の早急な開発が必要とされている。我々はWnt signal inhibitor、特にREIC/Dkk-3のGBMに及ぼす作用に注目し、REIC/Dkk-3が脳腫瘍組織で低下しており、この低下が脳腫瘍の増殖に関係していることを見出した。また脳腫瘍細胞系にREIC/Dkk-3をplasmidを用いて遺伝子導入することによりREIC蛋白を過剰発現させると、ミトコンドリアを介したアポトーシスが誘導されることを明らかにし、脳腫瘍治療におけるREIC/Dkk-3の重要性を証明した(Neuro Oncol. 2008)。

近年、REIC/Dkk-3をアデノウイルスを用いて遺伝子導入したREIC/Dkk-3アデノウイルスベクター(Ad-REIC)を用いた遺伝子治療は、他臓器癌、特に前立腺癌において既に多くの報告がある。癌細胞選択的に小胞体と呼ばれる細胞内小器官にストレスを誘導することにより、癌細胞選択的にアポトーシスへ導く作用があることも報告されている(Cancer Res 2005)。また一方で正常細胞(線維芽細胞)をAd-REICで感染させても正常細胞ではアポトーシスは誘導されず、逆にIL-7を誘導し、NK細胞を活性化して抗腫瘍効果をもたらすことが示されており、腫瘍特異的な細胞死誘導の分子機構が報告されている(JBC, 2009)。また米国において臨床試験の準備が進められ、臨床での効果と安全性についての評価が行われようとしている。

2. 研究の目的

(1) 研究成果を踏まえ着想に至った経緯

申請者らも正常ヒトアストロサイトにREIC/Dkk-3を遺伝子導入しても細胞傷害効果が低いことは既に報告し(Neuro Oncol. 2008;10:244-53)、GBMにおいても前記の如くAd-REICによるGBM細胞に対する直接効果と正常細胞に対する間接効果という二重の抗腫瘍効果が期待できるのでないかと考えた。これまでにREIC/Dkk-3遺伝子のin vivoにおける抗脳腫瘍効果の評価は行われていないことから、Ad-REICを用いてin vivoにおける抗脳腫瘍効果の評価するために本研究を行うこととした。

(2) これまでの研究成果を発展させる内容
従来我々の脳腫瘍研究は、ヌードマウスの背部皮下にヒトGBM細胞を移植したxenograftモデルを作製し研究に使用してきた。他施設では、ヒトGBM細胞をヌードマウス脳内に移

植したxenograftモデルを使用した動物実験の報告も見られる。しかし、いずれもxenograftモデルであるため実験結果がヒトGBM治療に直接的に応用できないこと、加えてヒトGBM細胞の入手に限界があることなどの問題点が以前から指摘されていた。今回我々は研究協力者である慶應義塾大学医学部先端医科学研究所遺伝子制御研究部門 佐谷秀行教授の研究室で確立された脳腫瘍モデルを用いる。このモデルは癌抑制遺伝子ノックアウトマウスより採取した神経幹細胞にレトロウイルスベクターを用いて癌遺伝子を導入し、induced Cancer Stem Cell(iCSC)を作製する。このiCSCはiPS細胞の原理を応用しており、iCSCをwild-typeマウスの脳内に移植することで組織学的にも極めてヒトglioblastomaに近い腫瘍を形成することが可能となっている(PNAS. 2009)。既に佐谷教授から研究協力を得てモデル作製のための準備を開始しており、実験系の確立が可能となっている。iCSCをマウス脳内に注入し脳腫瘍を誘発するモデルを用いることにより、xenograftモデルという従来からの問題点が解消し、飛躍的に研究を前進させることが期待できる。またこのモデルを確立すると同時平行してヒトGBM細胞の脳内注入によるxenograftモデルでAd-REICによる抗腫瘍効果を調べ、iCSCによるGBMモデルが確立された時点でAd-REICの本モデルでの抗腫瘍効果を評価し、多角的な解析により、ヒトGBM治療への応用という観点から可能性について検討する。将来的に臨床治療に応用できれば、新しいGBM治療のbreak throughとなることが期待される。

(3) 研究期間内の目標

induced Cancer Stem Cell(iCSC)を用いたマウス脳腫瘍(悪性神経膠腫)モデルの作製手技の確立一連の手技は、既にこのモデルを確立している慶應義塾大学佐谷教授の研究室での技術習得を終えている。

i) p16INK4a/p19Arf(-/-)マウス(癌抑制遺伝子ノックアウト)から神経幹細胞を分離培養し、細胞株を樹立する。

ii) レトロウイルスを用いてRAS-V12(癌遺伝子)を神経幹細胞(p16INK4a/p19Arf(-/-))に遺伝子導入し、iCSCを作製する。

iii) iCSCをwild typeマウス脳内に移植し、脳内に腫瘍が形成されるのを確認する。

iv) 形成された腫瘍を組織学的に解析し、GBMに類似していることを確認する。

iCSCマウス脳腫瘍モデルとAd-REICを用いた新規遺伝子治療法の開発

i) in vitro試験によるAd-REICの脳腫瘍増殖抑制効果の評価、その分子機構の解明

iCSCマウス脳腫瘍モデルの作製と平行してGBM細胞系に対する細胞増殖抑制効果をin vitroで調べる。これまでに細胞増殖抑制効果を確認して

おり、現在、その分子機構について検討している。
(未発表)

ii) iCSC マウス脳腫瘍モデルおよびヒト GBM 細胞 xenograft に Ad-REIC を脳内局所投与し、抗腫瘍効果を評価する。

3. 研究の方法

(1) induced Cancer Stem Cell (iCSC) マウス悪性神経膠腫モデルの作製手技確立

神経幹細胞に癌遺伝子を導入して脳腫瘍幹細胞(特に悪性神経膠腫の幹細胞)を作製する原理は、基本的にはiPS細胞の原理を利用したものである。癌抑制遺伝子にp16INK4aとp19Arf、癌遺伝子にはRAS-V12、レトロウイルスベクター作製にはPLAT-E(パッケージング細胞)を用いて作製する。

癌抑制遺伝子(INK4a/arf)ノックアウトマウスから神経幹細胞を分離培養

マウスはC57BL6を使用し、p16INK4a/p19Arf(-/-)マウス(ホモタイプ)は免疫不全傾向が強く、長期生存できないという特徴があり、NK4a(-)マウス(ヘテロタイプ)とArf(-)マウス(ヘテロタイプ)を交配させてホモタイプを同定し、神経幹細胞分離培養のドナーとして使用する。

PLAT-E(レトロウイルスパッケージング細胞)を用いて癌遺伝子(RAS-V12)が導入されたレトロウイルスベクターを作製

癌遺伝子(RAS-V12)とGFP発現遺伝子の双方が組み込まれたPlasmidをPLAT-Eにtransfectionして、PLAT-Eにレトロウイルスベクターを産生させる。

(上記で分離培養した)神経幹細胞にレトロウイルスを感染させ癌遺伝子(RAS-V12)

を導入することにより、脳腫瘍幹細胞 iCSCs (induced Cancer Stem Cells)を作製

分離培養した神経幹細胞(INK4a/Arf(-/-))にRASを遺伝子導入することにより、分化すれば悪性神経膠腫を形成する脳腫瘍幹細胞を作製することができる。

iCSCsをマウス(SPF化wild type C57BL6)

脳内に移植し、移植部位で腫瘍が形成されるのを確認

初期の段階ではモデルマウスの脳腫瘍を摘出し、H&E染色や免疫染色などの病理組織によるヒトGBMとの組織所見の差異を評価する。またiCSCにはGFP発現遺伝子が導入されているため、腫瘍形成の範囲や浸潤の有無なども評価できる。

(2) Ad-REICの悪性神経膠腫に対する効果とその作用機序を明らかにし、脳腫瘍モデルにおけるAd-REICの抗腫瘍効果を検討する。

ヒトGBM細胞のxenograftモデルを用いての検討

GBM細胞系でAd-REICを用いて遺伝子導入

した場合の至適なMOI数を検討するため、かつ最適な腫瘍細胞注入数を検討するため、iCSC脳腫瘍モデルの確立と平行して、ヒトGBM細胞のxenograftモデルを用いてin vivoでのAd-REICの抗腫瘍効果の評価を行う。コントロールとしてLacZ(ガラクトシダーゼ発現遺伝子)を組み込んだAd-LacZで処理したGBM細胞を用いる。各々定位脳装置をもちいてあらかじめAd-REICで遺伝子導入あるいはAd-LacZで処理したGBM細胞を脳室内に注入し、脳腫瘍増大抑制効果および延命効果を評価する。またこの抑制作用に寄与した分子機構を免疫組織学的評価や定量RT-PCRによる遺伝子解析により調べる。

iCSC脳腫瘍モデルでの検討

確立したiCSC脳腫瘍モデルの脳腫瘍内部に上記で設定した至適MOI数のAd-REICを局所投与し、腫瘍縮小効果や延命効果を評価する。コントロール群には、Ad-LacZを用いて同様に行う。

近年、当大学施設では生存した状態で画像解析可能なIVIS Lumina imaging system(ルシフェラーゼ発光及び各種蛍光蛋白を感知)が利用可能となっている。感性した脳腫瘍モデルを用いて脳腫瘍の縮小効果を継続的にモニターする。

またAd-REIC投与後の腫瘍の病理組織学的評価や腫瘍細胞におけるREIC発現やその他Wnt signalingに關与する分子の発現の差異の有無についても免疫組織学的に局在を調べたり、western blotによる蛋白発現度合いの評価を行う。また細胞特異的な発現分子が認められた場合には

microdissectionにより採取したsampleで部位特異的なmRNA発現レベルを解析する。

GBM細胞を用いた細胞増殖抑制増強作用の検討

REIC遺伝子導入はcaspase-9、および-3活性化を介したミトコンドリアを介したapoptosisを誘導し、 β -cateninによる細胞増殖に寄与する分子の転写活性を抑制することを既に報告している。最近予備検討から脳腫瘍への効能を有する

interferon- β がtemozolomideの併用で効果増強が認められ、その作用にdeath receptorを介したapoptosisの亢進が寄与する可能性がある結果が得られている。そこでREIC遺伝子導入にinterferon- β を併用することで殺細胞作用の増強がはかれるかどうかについて解析し、これらの効果増強の分子機構を調べる。

効果増強作用の可能性が高いと推察される場合には、確立した脳腫瘍モデルでこの増強効果を検討する。

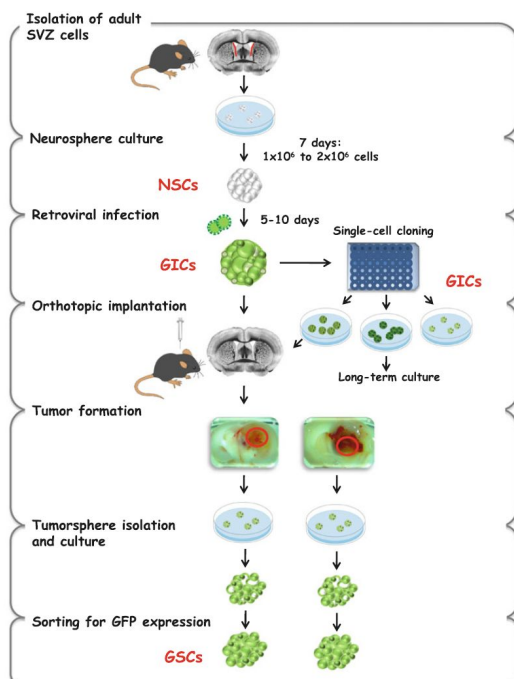
(3) REIC/Dkk-3 遺伝子導入により脳腫瘍縮小効果がみられたマウスと未治療マウスの脳組織内の microRNA の解析から新たに腫瘍増殖、生存、転移などに関与する分子と抗腫瘍効果に寄与する分子を探索する試みを行い、標的分子が検出できた時点で REIC/Dkk-3 遺伝子との関連性について調べる。

4. 研究成果

抗腫瘍遺伝子である Dkk ファミリーの Reduced expression in immortalized cells/Dkkopf-3 (REIC/Dkk-3) が脳腫瘍組織で低下しており、この低下が脳腫瘍の増殖に関係していることを見出した。また脳腫瘍細胞系に REIC/Dkk-3 を plasmid を用いて遺伝子導入することにより REIC 蛋白を過剰発現させると、ミトコンドリアを介したアポトーシスが誘導されることを見出し、脳腫瘍治療における REIC/Dkk-3 の重要性を証明した。さらに臨床応用を目指して以下の研究を進めている。

(1) iCSCマウス脳腫瘍モデルの確立

従来の脳腫瘍研究では、ヌードマウスの背部皮下にヒトGBM細胞を移植した xenograftモデルが使用されているが、固形がんのため実験結果が浸潤性のヒトGBMに対する治療に直接的に応用できないことが指摘されていた。そこで慶應義塾大学医学部先端医科学研究所遺伝子制御研究部門 佐谷秀行教授の研究室で確立されたヒト脳腫瘍に類似した浸潤性の脳腫瘍モデルを用いて、抗腫瘍効果を評価することとした。癌抑制遺伝子ノックアウトマウスより採取した神経幹細胞にレトロウイルスベクターを用いて癌遺伝



子を導入し、induced Cancer Stem Cell (iCSC)を作製し、この細胞をwild-typeマウスの脳内に移植することで組織学的にも極めてヒトglioblastomaに近い腫瘍を形成することが可能となった(PNAS, 2009)。一連の技術習得を終え、形成された腫瘍が組織学的にGBMに類似していることを確認し、脳腫瘍に対する抗腫瘍効果の評価を行う計画である。

(2) iCSCマウス脳腫瘍モデルを用いたAd-REICによる遺伝子治療法の開発

iCSCマウス脳腫瘍モデルの作製と平行してアデノウイルスベクターによる-REIC遺伝子導入によるGBM細胞系に対する細胞増殖抑制効果を in vitro系および xenograftモデルで確認した。またこの細胞増殖抑制効果のメカニズムが Wnt シグナル上流での Wnt 蛋白とその受容体の優先的な結合阻害が下流で働く機能分子の抑制につながることを明らかにした。この結果を論文化し neuro-oncology に投稿し、review 中である。

さらに Ad-REIC による薬物排泄ポンプ MDR1, MRP1, AGCB2 の発現の抑制を介した抗腫瘍薬の temozolomide の効果増強作用を調べている。

平成 23 から 24 年度にかけての計画は、Induced Cancer Stem Cell (iCSC)マウス悪性神経膠腫モデルの作製手技を確立すること、Ad-REIC の悪性神経膠腫に対する効果とその作用機序を明らかにするとともに、効果増強作用の可能性が高いと推察される場合には、確立した脳腫瘍モデルでこの増強効果を検討することであった。24 年度にはさらに、REIC/Dkk-3 遺伝子導入により脳腫瘍縮小効果がみられたマウスと未治療マウスの脳組織内の microRNA の解析から、新たに腫瘍増殖、生存、転移などに関与する分子と抗腫瘍効果に寄与する分子を探索する試みを行い、標的分子が検出できた時点で REIC/Dkk-3 遺伝子との関連性について調べた。

従来我々の脳腫瘍研究は、ヌードマウスの背部皮下にヒト GBM 細胞を移植した xenograft モデルを作製し研究に使用してきた。しかし、実験結果がヒト GBM 治療に直接的に応用できないことが指摘され、慶應義塾大学医学部先端医科学研究所遺伝子制御研究部門 佐谷秀行教授の研究室で確立された脳腫瘍モデルを用いて行った。一連の手技の技術習得を終え、形成された腫瘍が組織学的に GBM に類似していることを確認しており、MRI で脳腫瘍の評価が可能になっている。アデノウイルスベクターによる-REIC 遺伝子導入による GBM 細胞系に対する細胞増殖抑制効果を in vitro系および xenograftモデルで確認した。またこの細胞増殖抑制効果のメカニズムが Wnt シグナル上

流での Wnt 蛋白とその受容体の優先的な結合阻害が下流で働く機能分子の抑制につながることを明らかにすることができ、ほぼ当初の計画通りに成果を上げることができた。

今後は更に下記の如く研究を推進させていく計画である。

iCSC マウス脳腫瘍モデルが持続的に作製できる準備を行う

マウス脳腫瘍モデルを用いて REIC 遺伝子療法の可能性を評価する。

マウス脳腫瘍モデルを用いて REIC 遺伝子療法のメカニズムとして薬物排出ポンプの抑制による他剤併用効果を明らかにする。

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 3件)

- 1) Okazaki T, Kageji T, Mizobuchi Y, Miyamoto T, Nagahiro S, Nine-year interval recurrence after treatment of boron neutron capture therapy in a patient with glioblastoma: A case report. Appl Radiat Isot(査読有) 2014, 88: 28-31
- 2) Kageji T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H, Correlation between radiation dose and histopathological findings in patients with glioblastoma treated with boron neutron capture therapy (BNCT). Appl Radiat Isot(査読有) 2014, 88: 20-22
- 3) Kurashiki Y, Kageji T, Mizobuchi Y, Satomi J, Satoh K, Hirose T, Nagahiro S, Differential diagnosis of and therapy for anaplastic astroblastoma: case report and review of the literature]. No Shinkei Geka(査読有) 2013, 41: 891-899

[学会発表](計 4件)

- 1) Hara K, Kageji T, Mizobuchi Y, Kitazato KT, Okazaki T, Fujihara T, Nakajima K, Mure H, Kuwayama K, Hara K, Nagahiro S, Dkk-3, one of Dickkopf (Dkk) family members, contributes to the anti-tumor effects in glioblastoma through regulation of both Wnt signal pathways SNO 2013, 2013.10.19-21, Moscone West Convention Center (San Francisco, USA)
- 2) Nakajima K, Hara K, Kageji T, Mizobuchi Y, Kitazato KT, Fujihara T, Kuwayama K,

Otsuka R, Kung DK, Nagahiro S, Down-regulation of MDR by Ad-Dkk3 contributes to augment the chemotherapy by temozolomide. SNO 2013, 2013.10.19-21, Moscone West Convention Center (San Francisco, USA)

- 3) Mizobuchi Y, Okazaki T, Kageji T, Kuwayama K, Kitazato KT, Mure H, Hara K, Morigaki R, Matsuzaki K, Nakajima K, Fujihara T, Nagahiro S, A combination of interferon- β and temozolomide augments anti-tumor effects through p73/YAP-mediated apoptosis by PML in glioblastoma. SNO 2013, 2013.10.19-21, Moscone West Convention Center (San Francisco, USA)
- 4) 原慶次郎、溝淵佳史、北里慶子、岡崎敏之、影治照喜、永廣信治、公文裕巳、悪性神経膠腫における REIC/Dkk-3 遺伝子導入による Wnt 蛋白制御の意義、第 13 回日本分子脳神経外科学会、2012.09.20-21、熊本市国際交流会館(熊本県熊本市)

[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

影治 照喜 (KAGEJI, Teruyoshi)
徳島大学・病院・特任教授
研究者番号：70294684

(2) 研究分担者

溝淵 佳史 (MIZOBUCHI, Yoshifumi)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

様式 C - 19、F - 19、Z - 19、CK - 19 (共通)

研究部・助教

研究者番号： 80547993

永廣 信治 (NAGAHIRO, Shinji)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号： 60145315

牟礼 英生 (MURE, Hideo)

徳島大学・病院・助教

研究者番号： 00624355

倉敷 佳孝 (KURASHIKI, Yoshitaka)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号： 10597503

(3)連携研究者

()

研究者番号：