

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791563

研究課題名(和文) 脊髄・脳グリオーマに対する分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Molecularly targeted therapy for Glioblastoma

研究代表者

岩波 明生 (IWANAMI, AKIO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40327557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄・脳グリオーマの治療は現在、外科的切除と放射線・化学療法の併用であるが、治療成績は良いとは言えず、新しい治療法の実現が急務である。再発の原因として、腫瘍細胞の化学療法への抵抗性が挙げられるが、そのメカニズムは明らかではない。一方PML (Promyelocytic leukemia)は腫瘍抑制因子であるが、細胞の生存や恒常性の維持にも深く関与している。

本研究で我々は、PMLがGlioblastomaの腫瘍組織中の約40%に高発現し、薬剤抵抗性に寄与していることをin vitro, in vivoで示し、PMLを選択的に分解する亜ヒ酸を用いることで、薬剤感受性の増大が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Glioblastomas (GBMs) are resistant to series of therapy. We analyzed GBM cell lines, and clinical samples from patients in phase 1 clinical trials, and find that the promyelocytic leukemia (PML) mediates resistance to mTOR-targeted therapies. Direct mTOR inhibitors that block downstream mTOR signaling promote PML expression in GBMs, and genetic overexpression and knockdown approaches demonstrate that PML prevents mTOR-dependent cell death. Low doses of the PML inhibitor, arsenic trioxide, abrogate PML expression and reverse mTOR kinase inhibitor resistance in vivo, thus markedly inhibiting tumor growth and promoting tumor cell death in mice. These results identify a unique role for PML in mTOR inhibitor resistance and provide a strong rationale for a combination therapeutic strategy to overcome it.

研究分野：脊椎脊髄

キーワード：グリオーマ 分子標的療法 PML 脊髄腫瘍 脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは脊髄腫瘍の約 20%、脳腫瘍の約 25%を占める中枢神経系の悪性腫瘍である。脊髄・脳グリオーマの主要な治療は現在、外科的切除に放射線・化学療法(テモゾロマイドなど)を併用する方法である(Stupp R et al., *N Engl J Med* 2005)が、治療成績は決して良いとは言えず、最も悪性度の高い Glioblastoma (GBM)では1年生存率が約50%とガンの中でもっとも予後が悪い。また脊髄のGBM(胸髄)においては、延命のために敢えて脊髄離断術を行わざるを得ないケースがある(Nakamura M et al., *J Neurosurg Spine* 2010)など、患者への肉体的・精神的負担は計り知れず、新しい治療法の開発が急務である。再発の原因として、腫瘍細胞の化学療法への抵抗性が挙げられるが、そのメカニズムは明らかではない。一方PML (Promyelocytic leukemia)は腫瘍抑制因子であるが、細胞の生存や恒常性の維持にも深く関与している。近年PMLが血液腫瘍幹細胞や神経前駆細胞に高発現し、さらに腫瘍再発の一因であることが報告されてきた(Ito et al, *Nature* 2008)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PMLのGBMにおける発現・機能を解析し、その腫瘍増殖や薬剤抵抗性に関するメカニズムを明らかにすることで今後の新しいGBM治療の一助とすることである。

3. 研究の方法

星細胞腫患者由来腫瘍組織の解析：UCLAで手術を受けたGBM患者87名の腫瘍組織を免疫組織学的に解析しPMLの発現やKi-67、腫瘍増殖に関わるEGFシグナルの関連分子(p-S6)の発現の検討を行った。

GBM細胞におけるPMLの*in vitro*での機能解析：U87細胞に抗腫瘍薬剤

Rapamycinを投与し、PMLの発現の変化をWestern blottingや免疫蛍光染色により解析した。一方、U87細胞にPMLをretroviral vectorを用いて高発現させ、細胞増殖能や薬剤感受性の変化を検討した。

GBM細胞に対するPML knockdown (KO)と薬剤感受性効果：U87, U251, LN229細胞にsiRNAを用いてPMLのKOを行い、抗腫瘍薬剤Rapamycinやpp242, Erlotinibを投与し、細胞増殖能や薬剤感受性を対照群と比較した。

GBM細胞に対する亜ヒ酸(AS2O3)を用いたPML-targetingの効果：AS2O3はPMLに直接作用しこれを分解すると報告されている(Zhang et al, *Science* 2010)。U87細胞に対しAS2O3を投与し、PMLが分解されるか否か、またその至適濃度をWestern blottingにより検討した。

GBMに対するAS2O3併用療法の有効性：U87細胞に対して、AS2O3+pp242, AS2O3のみ, pp242のみを投与し各群間で細胞増殖能やアポトーシス、薬剤感受性をWestern blottingやTUNEL染色により比較検討した。

4. 研究成果

組織学的解析：約41%のGBM患者においてPMLは高発現していた。一方これらの患者においてKi-67, p-S6の発現は低下し細胞増殖能は高くないことが示唆された(図1)。

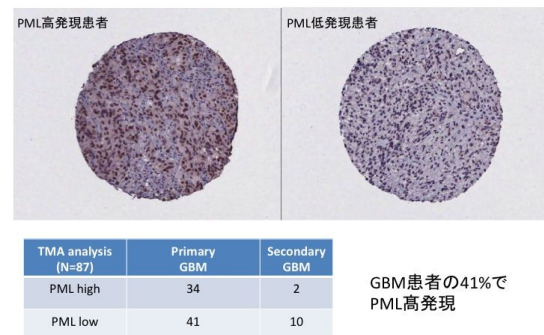


図1 GBM患者組織中におけるPMLの発現

In vitro: U87 細胞は Rapamycin 投与後 PML 発現の上昇が認められた。一方 U87PML 高発現細胞においては、対照群に比し細胞増殖が低下する(図 2)と同時に Rapamycin などの薬剤抵抗性も有意に増大した(図 3)。

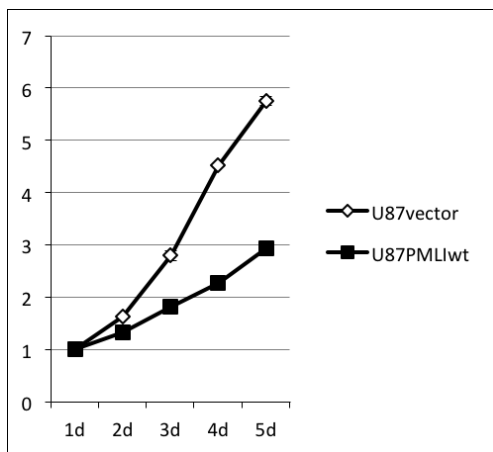


図 2 PML 高発現グリオーマ細胞の増殖度

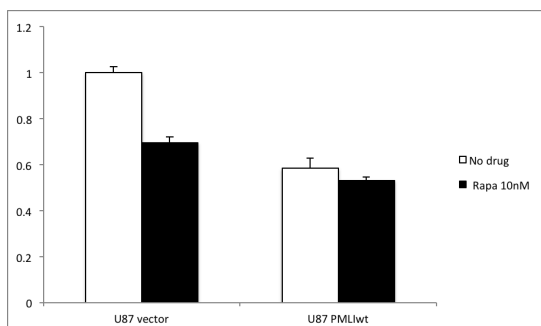


図 3 PML 高発現グリオーマ細胞の Rapamycin に対する薬剤抵抗性

U87, U251, LN229 細胞は PML KO により有意に薬剤感受性が増大し死滅した(図 4)。

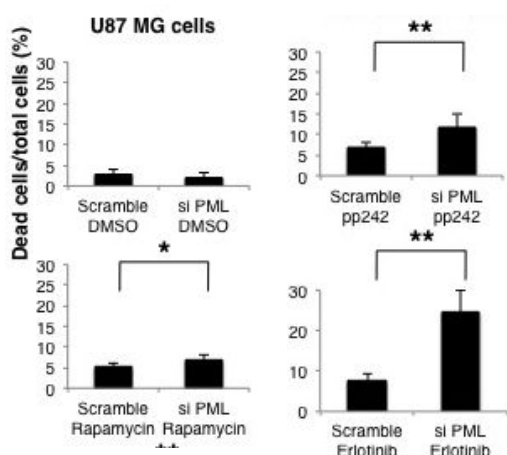


図 4 PMLKO による薬剤抵抗性の増大

0.15 μ M という低濃度の AS2O3 投与により、U87 細胞は PML の分解を引き起こした。

AS2O3+pp242 併用療法群において、有意に U87 細胞はアポトーシスをおこし死滅した(図 5)。

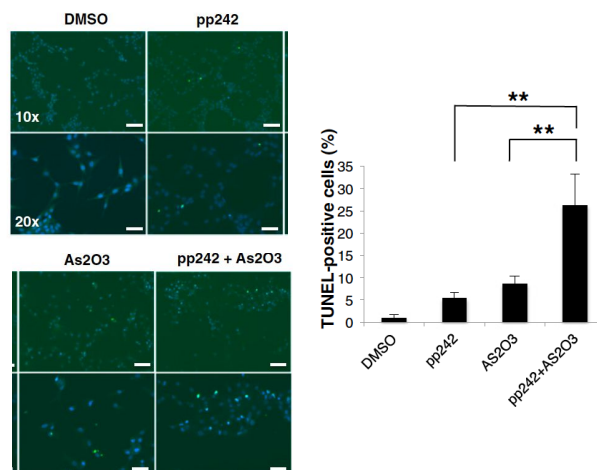


図 5 PML-targeting によるグリオーマ細胞の死滅

腫瘍抑制因子とされる PML が GBM 患者の約半数でむしろ高発現していたことは興味深い。Rapamycin 投与により、U87 細胞での PML 発現が上昇すること・PML 高発現細胞が薬剤抵抗性を持つことから PML 自体が薬剤抵抗性に関与していることが示唆される。PML の発現上昇により細胞が dormant な状態となることが薬剤抵抗性の一因になっていると考えられる。また今回実際に PML を KO することにより薬剤感受性が増大することが分かった。AS2O3 は臨床応用されている薬剤であり、今後は GBM に対する新たな治療戦略として、AS2O3 と従来の化学療法の併用療法の有効性が期待される。同時に PML による薬剤抵抗性のメカニズムについても、PML 高発現細胞株を用いたトランスクリプトーム解析、メタボローム解析の結果を加えて今後より詳細なメカニズムの解明を行いたいと考えている。

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 2 件)

1. **Iwanami A**, Gini B, Zanca C, Matsutani T, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari FB, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel PS. Pml mediates glioblastoma resistance to mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted therapies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:4339-4344 (査読あり)

2. **Iwanami A**, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Arsenic reverses glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. *Cell Cycle*. 2013;12:1473-1474 (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

1. **岩波明生** Paul S. Mischel 戸山芳昭 中村雅也
腫瘍抑制因子 PML を target とした星細胞腫の分子標的療法の開発 (第二報) PML 標的による星細胞腫の薬剤感受性効果の検討
日本脊椎脊髄病学会 2013年4月27日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

2. **岩波明生** Paul S. Mischel 戸山芳昭 中村雅也
腫瘍抑制因子 PML を target とした星細胞腫の分子標的療法の開発 (第二報) PML 標的による星細胞腫の薬剤感受性効果の検討
日本整形外科学会基礎学術集会 2013年10月18日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他] 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岩波 明生 (AKIO IWANAMI)
慶應義塾大学整形外科助教
研究者番号: 40327557