

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462264

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対するAd-REICの抗腫瘍効果とWntシグナル制御の分子機構

研究課題名(英文) Anti-tumor effects and Regulation of Wnt signaling pathway of adenovirus-mediated DKK3 in glioblastoma

研究代表者

溝渕 佳史 (MIZOBUCHI, Yoshifumi)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：80547993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：グリオブラストーマ(GBM)細胞においてDKK-3のアデノウイルスベクター(Ad-DKK-3)を用いて遺伝子導入することにより、BrdU取り込みが抑制され、細胞増殖抑制作用を確認し、Wnt signal上流で作用するタンパクWnt3a, Wnt5a, LRP6 およびROR2に対するDkk-3による制御機構を調べ、これらのタンパク制御による下流分子への影響を調べた。遺伝子導入で増加したDKK-3蛋白によりWnt 蛋白の発現やその受容体との相互作用を抑制し、Wnt シグナル上流での活性化が抑制され、下流分子に影響することで β -catenin依存性および非依存性に抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The effect of the third member of the Dickkopf family (DKK3) in the Wnt pathway in glioblastoma remains unclear. We first demonstrated the non-specific interaction of Wnt3a and Wnt5a with the receptors LRP6 and ROR2 and the up-regulation of the Wnt pathway in glioblastoma cells. We used an adenovirus vector and found that an increase in DKK3 protein attenuated the expression of Wnt3a, Wnt5a and LRP6, but not of ROR2, and their interaction, thereby affecting both canonical- and non-canonical Wnt downstream cascades. This produced anti-tumor effects in GBM xenograft models. The suppression of Wnt pathways upstream by DKK3 may have promise for the treatment of glioblastoma.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 グリオブラストーマ Wnt DKK3 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

グリオブラストーマは、最も治療に難渋している脳腫瘍であり、浸潤能、組織破壊性が強く、手術療法、化学療法、放射線療法を組み合わせても、治療効果が乏しく、現在でも、平均生存期間は1年以内である。

Wnt は分泌型の glycoprotein であり、胚形成や皮質の発達に重要な役割を果たす。7 回膜貫通型の G-protein 受容体に結合し、いくつかの異なったシグナル伝達経路に作用することが、他の細胞系で報告されており、-catenin 依存性と非依存性経路があることが知られている。-catenin 依存性経路では Wnt3a タンパクが受容体 LRP5/6 に結合し、非依存性経路では Wnt5a が受容体 ROR2 に結合して Wnt シグナルが活性化されると考えられている。しかし、この Wnt シグナル上流でのタンパクの相互作用やこの経路の活性化の分子機構についての詳細はグリオーマ細胞では検討されていない。またこれらのタンパク制御が抗腫瘍効果に寄与するかどうか明らかでない。

申請者はこれまでに悪性脳腫瘍症例において Wnt signal 阻害物質である REIC/Dkk-3 の発現が遺伝子レベルから腫瘍の悪性度に応じて低下しており、REIC/Dkk-3 の低下が脳腫瘍の増殖に関係していることを見出している (Neuro Oncol. 2008)。また、グリオーマ細胞に plasmid を用いて REIC/Dkk-3 (以下 DKK-3 と略す) を遺伝子導入し、DKK-3 蛋白を過剰発現させた細胞では、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、脳腫瘍における -catenin を介した Wnt シグナルの重要性を証明した。さらに、予備実験から、剖検例の正常脳および脳腫瘍周囲の正常部位では Wnt 受容体 LRP6 の発現は低い、脳腫瘍の悪性度が高くなるに従い、LRP6 の発現は増加し、grade IV の GBM では LRP6 が強発現していることを見出している。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍において Wnt signal 阻害物質である Dkk-3 が低下し、Wnt signal レセプターである LRP6 の発現が上昇している結果から、Wnt signal の活性化の増減が腫瘍細胞の増殖や細胞死に強く関与していることが推察され、その詳細な分子機序を解明する必要があるが、脳腫瘍に対して、効果的な遺伝子治療は存在していないことから、アデノウイルスベクター (Ad- DKK-3) を用いて DKK-3 タンパクを発現させ、Wnt シグナルを制御することが抗腫瘍効果に反映されるかどうかを in vivo で評価するとともに、Wnt signal 活性化の詳細な分子機序を解明し、治療のターゲットを同定することが新しい治療薬開発へのアプローチになると考えた。

3. 研究の方法

GBM 細胞を移植した xenograft モデルでは体重には影響がない用量 control vector (Ad-LacZ) と較べていく。

4. 研究成果

到達目標は達成され、英文誌に投稿、受理された。この知見はグリオブラストーマに対する遺伝子治療の可能性と Wnt シグナルを標的とした治療の可能性を示唆しており、大いに意義があると考えられる。GBM における薬剤抵抗性の一つとして薬物の組織内滞留時間の問題が考えられている。REIC/Dkk-3 による抗腫瘍効果が確認できれば、現在使用されている承認薬との併用で治療効果を増強することが可能かどうかを調べる。薬物排出にかかわる分子である MRP1 および MDR 1 に着目してこれらへの影響を調べる。これらの分子は実験レベルでは腫瘍細胞に高く発現しており、REIC によって低下する予備データを得ている。これらの分子の発現抑制が確認できれば臨床における他剤との併用による効果増強も期待できる。

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 8 件)

- 1) Mizobuchi Y, Kageji T, Tadashi Y, Nagahiro S. Craniotomy for cerebellar hemangioblastoma excision in a patient with von Hippel-Lindau disease complicated by uncontrolled hypertension due to pheochromocytoma. Int J Surg Case Rep. 2015;17:96-99. 査読あり
- 2) Abe T, Mizobuchi Y, Sako W, Irahara S, Otomi Y, Obama Y, Nakajima K, Khashbat D, Majigsuren M, Kageji T, Nagahiro S, Harada M. Clinical Significance of Discrepancy between Arterial Spin Labeling Images and Contrast-enhanced Images in the Diagnosis of Brain Tumors. Magn Reson Med Sci. 2015;14:313-319. 査読あり
- 3) Abe T, Mizobuchi Y, Nakajima K, Otomi Y, Irahara S, Obama Y, Majigsuren M, Khashbat D, Kageji T, Nagahiro S, Harada M. Diagnosis of brain tumors using dynamic contrast-enhanced perfusion imaging with a short

- acquisition time. Springerplus. 2015, 24;4:88. 査読あり
- 4) Hara K, Kageji T, Mizobuchi Y, Kitazato K, Okazaki T, Fujihara T, Nakajima K, Mure H, Kuwayama K, Hara T, Nagahiro S. Blocking of the interaction between Wnt proteins and their co-receptors contributes to the anti-tumor effects of adenovirus-mediated DKK3 in glioblastoma. Cancer Lett. 2015;356:496-505. 査読あり
 - 5) Kageji T, Nagahiro S, Mizobuchi Y, Matsuzaki K, Nakagawa Y, Kumada H. Boron neutron capture therapy (BNCT) for newly-diagnosed glioblastoma: comparison of clinical results obtained with BNCT and conventional treatment. J Med Invest. 2014;61:254-263 査読あり
 - 6) 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. 2014;88:20-22. 査読あり
 - 7) 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. 2014 Jun;88:28-31. 査読あり
 - 8) 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. 2013;41:891-899. 査読あり

〔学会発表〕(計 11件)

- 1) K.Shono,T.Kageji,Y.Mizobuchi, T.Fujihara, K.Kitazato, K.Nakajima, H.Mure, K.Kuwayama, S.Nagahiro, Sonodynamic 5-ALA plus ultrasound therapy augments anti-tumor effects in the oncogene knock-in glioma stemcells 20th Annual Societific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, 2015.11.19-22, Texas,USA
- 2) T.Fujihara, T.Kageji, Y.Mizobuchi, R.Otsuka K.Kitazato, K.Hara, K.Shono, K.Nakajima H.Mure, K.Kuwayama, S.Nagahiro Down-regulation of MDR1 by DKK3 attenuates chemoresistance to temozolomide, and potentiates its anti-tumor effects 20th Annual Societific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology 2015.11.19-22, Texas, USA
- 3) T.Kageji, Y.Mizobuchi, K.Nakajima, S.Nagahiro, H.Watanabe, N.Inoue, K.Okamura, S.Kagami Intensive chemotherapy followed by reduced radiation dose for intracranial non-germinomatous germ cell tumors 20th Annual Societific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology 2015.11.19-22, Texas, USA
- 4) T. Kageji, Y. Mizobuchi, K. Nakajima, S. Nagahiro, H. Watanabe, N. Inoue, K. Okamura, S. Kagami Intensive chemotherapy followed by reduced radiation dose for intracranial

- non-germinomatous germ cell tumors
13th Congress of the World
Federatoin of Interventional and
Therapeutic Neuroradiology
2015.11.9-13, Gold Coast, Australia
- 5) T.Kageji, Y.Mizobuchi, K.Nakajima,
S.Nagahiro, H.Watanabe, N. Inoue,
K.Okamura, S.Kagami Strategy and
Clinical Results for Intracranial
Non-germinomatous Germ Cell Tumors
Induced Intensive Chemotherapy The
4th International CNS Germ Cell
Tumor Symposium 2015.4.12-15, Tokyo,
Happo-en, 東京都, 港区
- 6) H.Watanabe, N. Inoue, K.Okamura,
S.Nagahiro, Y.Mizobuchi,
K.Nakajima, T.Kageji, S.Kagami
Intensive Chemotherapy Followed by
Reduced Dose Radiation for
Intracranial Non-germinomatous Germ
Cell Tumors The 4th International
CNS Germ Cell Tumor Symposium
2015.4.12-15, Happo-en, 東京都, 港区
- 7) Kageji T, Oka H, Obata K, Bando
H, Tabata R, Kohno M, Surgical
strategy for intracranial malignant
germ cell tumor to prevent CNS
dissemination, The 7th KURE
International Medical Forum (K-INT)
in 2014, 2014.7.11-13, 呉メディカル
センター, 広島県, 呉市
- 8) Kageji T, Mizobuchi Y, Nakajima
K, Nagahiro S, Nakagawa Y,
Radiation-induced meningiomas after
BNCT in patients with malignant
glioma, 16th International Congress
on Neutron Capture Therapy,
2014.6.14-19, Helsinki, Finland
- 9) Mizobuchi Y, Okazaki T, Kageji T,
Kuwayama K, Kitazato K, Mure H, Hara

- K, Morigaki R, Matsuzaki K,
Nakajima K, Fujihara T, Nagahiro S,
A combination of interferon-beta and
temozolomide augments anti-tumor
effects through p73/YAP-mediated
apoptosis by PML in glioblastoma, SNO
2013, 2013.11.21-24, San
Francisco, USA
- 10) Nakajima K, Hara K, Kageji T,
Mizobuchi Y, Kitazato K, Fujihara
T, Kuwayama K, Otsuka R, D K.Kung,
Nagahiro S, Down-regulation of MDR
by Ad-REIC contributes to augment
the chemotherapy by temozolomide,
SNO 2013, 2013.11.21-24, San
Francisco, USA
- 11) Hara K, Kageji T, Mizobuchi
Y, Kitazato K, Okazaki T, Fujihara
T, Nakajima K, Mure H, Kuwayama K, Hara
T, Nagahiro S, REIC/Dkk-3, one of
Dickkopf (Dkk) family members,
contributes to the anti-tumor
effects in glioblastoma through
regulation of both Wnt signal
pathways, SNO2013, 2013.11.21-24, San
Francisco, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝淵 佳史 (MIZOBUCHI, Yoshifumi)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：80547993

(2) 研究分担者

牟礼 英生 (MURE, Hideo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：00624355

永廣 信治 (NAGAIRO, Shinji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：60145315

影治 照喜 (KAGEJI, Teruyoshi)
徳島大学・病院・特任教授

研究者番号：70294684

桑山 一行 (KUWAYAMA, Kazuyuki)
四国こどもとおとなの医療センター・臨床研
究部・脳神経外科医長
研究者番号：50614236

中島 公平 (NAKAJIMA, Kohei)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：40710554

原 慶次郎 (HARA, Keijirou)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：60710340