

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462175

研究課題名(和文) 幹細胞分化誘導薬を用いたCED法による膠芽腫新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy for glioblastoma using stem cell differentiating agent

研究代表者

園田 順彦 (SONODA, YUKIHIKO)

山形大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90302140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫幹細胞を培養し、そこに幹細胞分化誘導薬AICARを添加すると幹細胞マーカーの発現が低下し分化の誘導が確認された。細胞の毒性はAICAR投与により生じなかった。同様にマウス頭蓋内にAICARをCED法を用い投与したが明らかな毒性は認められなかった。次に膠芽腫細胞をマウス頭蓋内に投与し腫瘍形成したのち、AICARを投与し生存期間の延長が得られるか否かを検討した。しかしながらAICAR単剤では明らかな生存期間の延長は認められなかった。結果としてAICARは細胞の分化誘導を引き起こすが抗腫瘍効果は単剤では認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We cultured glioma stem cell and added AICAR which acts differentiation of stem cells.

As results, differentiation of gliomas with minimal toxicity was observed. In vivo study, we injected AICAR into normal mice brain by CED methods. No severe toxicity was observed in mice brain. Finally we created mouse brain tumor model by implantation of glioma stem cell, then treated with AICAR by CED. Unfortunately, no survival benefit was observed in treated group compared with control group. In conclusion, AICAR was strong effect for differentiation of glioma stem cell, however inhibition of cell growth was modest.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 腫瘍幹細胞 CED

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫の治療成績は、現時点でのあらゆる治療手段を用いても絶対的に不良である。膠芽腫は脳実質に広く浸潤する性格をもつ腫瘍であり、手術のみによる治癒は不可能とされ、放射線療法や化学療法による治療成績の向上が期待されている。

しかしながら膠芽腫は一般的に放射線化学療法抵抗性であり、手術単独療法に比較してもその生存期間の延長効果は1年にも満たない。膠芽腫を含め、がん腫の発生に深く関与していると考えられるのが、腫瘍幹細胞である。腫瘍幹細胞は腫瘍の起源をなす細胞であり、そこから分化した細胞がさまざまな表現型を呈し tumor heterogeneity が形成されると考えられている。分化した腫瘍細胞がある程度治療反応性を呈しても、腫瘍幹細胞が治療抵抗性であるなら根本的な治療にはならないと考えられる。したがって、膠芽腫の治療も今後は腫瘍幹細胞をターゲットとして考える必要があると思われる。

2. 研究の目的

本研究は「Convection enhanced delivery (CED)法を用いた、幹細胞分化誘導薬の脳実質内への投与」という膠芽腫に対する新規治療法を開発しようというものである。膠芽腫の予後はいまだ不良であり、治療成績の向上のためには、膠芽腫の治療抵抗性の大きな原因となっている膠芽腫幹細胞の病態を解明し、それに対する治療を考案することが不可欠である。近年、抗腫瘍薬として期待されている AMPK アゴニスト AICAR は正常神経幹細胞の分化作用も報告されている。そこで、膠芽腫幹細胞をラット脳内に移植し、AICAR を CED 法を用い脳内に投与し、その抗腫瘍効果と幹細胞の分化誘導作用を検討することを思い立った。本研究は、膠芽腫の新しい治療法として確立されるに十分な潜在能力を秘めていると考えられる。

3. 研究の方法

● 細胞

グリオーマ幹細胞として慶應義塾大学 佐谷秀行先生から提供いただいた bRiTs-G3 細胞を用いた。

● 薬剤の調整

5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) は、Sigma-Aldrich 社より購入 (cat# A9978)。AICAR 5mg を 950 μl PBS で溶解し 50mM とし、100 μl 毎に分注し -20 °C で保存し適宜希釈して使用した。

● 培養方法

bRiTs-G3 細胞株は recombinant human epidermal growth factor (20 ng/ml)、recombinant human basic fibroblastic growth factor (20 ng/ml)、B27 supplement without vitamin A、heparan sulfate (200 ng/ml)、penicillin/streptomycin (100 U/ml) を含む DMEM/F12 で 5% CO₂、37 °C 環境下

で培養した。

● Western blot 法

bRiTs-G3 細胞に PBS を加えたものを control、bRiTs-G3 細胞に 1mM AICAR を加えたものを治療群とし、培養細胞を 48 時間後に回収した。RIPA buffer にて全細胞溶解液を得た後に、10 μg の sample を SDS-PAGE 法にてタンパク分離し、転写、ブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応を通常通り行った。

4. 研究成果

● AICAR 投与による in vitro でのグリオーマ幹細胞性の低下

b-actin、GFAP、sox2、CD44、Nestin について検討した結果、幹細胞マーカーといわれる sox2、CD44、Nestin は治療群にて発現が低下し、GFAP では変化を認めなかった。AICAR 投与により幹細胞性の低下が示唆された (図 1)。

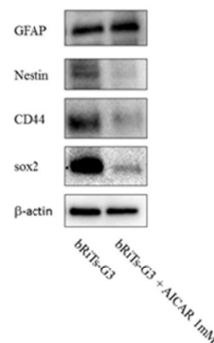


図1 western blotによる幹細胞マーカーの検討

● AICAR 投与による in vitro での細胞増殖抑制低下の検討

WST-8 法によって、AICAR の細胞毒性効果について検討した。投与した AICAR は 10, 5, 2.5, 1.25, 0.5, 0.25 mM である。投与後、48 時間培養し cell counting kit-8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) にて吸光度 (450nm) を測定した (図 2)。各濃度は n=4 で測定した。濃度を変えて AICAR

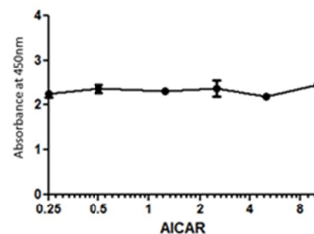


図2 cell viability assay

を投与しても、細胞増殖には影響がなかった。

● Neurosphere formation assay

グリオーマ幹細胞は neurosphere を形成しながら増殖していくことが特徴であり、

bRiTs-G3 細胞も同様に sphere を形成する。AICAR を 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5mM 投与し、48 時間培養した neurosphere の形成について測定した。核濃度 n=3 で行い、sphere の個数を測定すると、濃度依存性に sphere の形成が抑制された(図3)

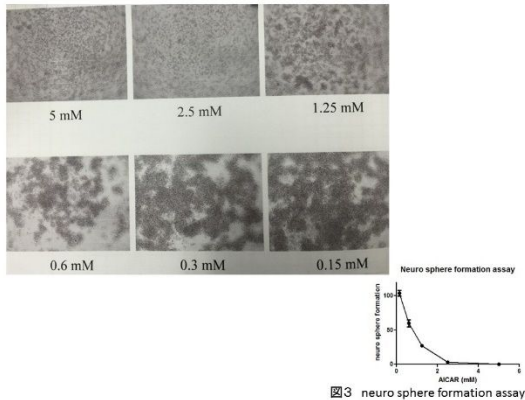


図3 neuro sphere formation assay

● AICAR の convection-enhanced delivery (CED) による投与

C57BL6/n 7 週令、雄のマウスをマウス用頭蓋固定器に固定した後、ブレグマより 0.5 mm 前方、矢状縫合より 2.5 mm 右側、深さ 3.5 mm の位置を注入点とした。1mM の AICAR 10 μ l を、微量薬剤投与ポンプを用いて、0.2 μ l/min で 15 分間、0.5 μ l/min で 10 分間、0.8 μ l/min で 2.5 分間投与し、その後シリンジポンプを止めてから 5 分間静置後に針を抜去した。まずは、AICAR の脳内投与による毒性の有無について検討するために、腫瘍細胞を移植していないマウスに対して、10 μ l 投与した後、体重変化、神経症状の有無、創部の状態などを 3 週間観察した。観察期間 3 週間内に体重の変化(図4)、神経脱落症状の出現、創部の変化は認められなかった。

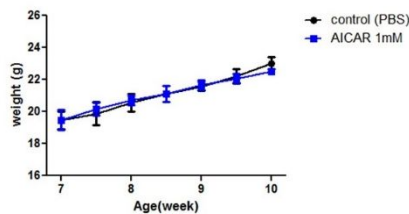


図4 AICAR 1mM脳内投与における体重変化

生存試験

1 \times 10⁴ 個の bRiTs-G3 細胞を 2 μ l の PBS に懸濁し、上記部位に移植した。移植 5 日後に前述の如く、AICAR 1 mM 10 μ l を CED にて投与した (AICAR の効果を検討するために 50mM 10 μ l で投与した群も検討)。Control 群では PBS 10 μ l を CED にて投与した(図5、各群 n=5)。しかしながら、いずれの群も control 群に比較して有意な生存延長効果は

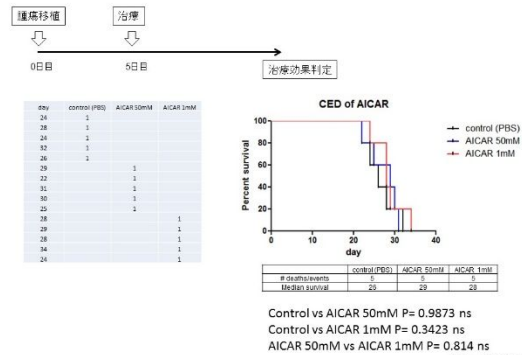


図5 生存試験

認められなかった。

考察

AICAR は in vitro では、細胞増殖抑制効果は認めなかったものの、幹細胞性は変化させた。in vivo では、AICAR 単剤で明らかな生存延長効果は見られなかった。膠芽腫の治療抵抗性にはグリオーマ幹細胞の存在が関与している可能性が報告されており、既存の治療 (TMZ+RT) や他の治療に AICAR を併用することで生存延長効果を認める可能性があり、今後さらなる検討が必要である。

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 1 件)

Shoji T, Saito R, Chonan M, Shibahara I, Sato A, Kanamori M, Sonoda Y, Kondo T, Ishii N, Tominaga T. Local convection-enhanced delivery of an anti-CD40 agonistic monoclonal antibody induces antitumor effects in mouse glioma models.

Neuro Oncol. 査読有 2016 18:1120-8

[学会発表](計 1 件)

庄司拓大、齋藤竜太、長南雅志、柴原一陽、佐藤綾那、金森政之、園田順彦、石井直人、近藤亨、富永悌二、腫瘍内での共刺激因子 CD40 刺激による新規脳腫瘍免疫治療法の開発 第 34 回日本脳腫瘍学会 2016 年 12 月 4 日-6 日 甲府富士屋ホテル 山梨県

[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

園田順彦 (SONODA Yukihiko)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 90302140

(2) 研究分担者

齋藤竜太 (Saito Ryuta)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10400243