

博士論文要約

主論文題名 Strong therapeutic potential of γ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells

Journal of Neuro-Oncology, 121: 239-250, 2015 掲載

専攻部門 脳医科学専攻脳・脊髄機能制御学

氏名 田中慎吾

(主任教員 中田光俊 教授)

[背景] 膠芽腫 (glioblastoma = GBM) は脳腫瘍の中で最も悪性かつ制御困難な腫瘍である。腫瘍摘出術に加え放射線化学療法を施行しても生存期間は 2 年未満の症例が多い。がん幹細胞仮説が提唱されて以降、GBM 幹細胞を標的とする治療が重要視されている。Notch シグナルは正常細胞および癌細胞において幹細胞維持制御などに関与する重要なシグナルである。さらに Notch シグナルは、GBM で最も重要な Akt シグナルも含め様々なシグナルと関係している。したがって Notch シグナルの制御が新たな癌治療として期待されている。GBM においても Notch シグナルが細胞増殖やアポトーシス制御、幹細胞形質維持を担っていることが報告されている。Notch シグナルを阻害する新規 γ -セクレターゼ阻害剤 MRK003 (以後 MRK) は、膵臓がん、乳がん、T リンパ性白血病に対する有効性が報告されている。しかしながら、GBM 幹細胞に対する MRK の有効性は評価されていない。そこで、9 人の患者由来の GBM 幹細胞を使用し MRK の有効性を *in vitro* で評価した。

[方法] 9 種類の患者由来の GBM 幹細胞 (30R, 1123M, MD13, Me83, 528P, 157NS, 146NS, TGS01, TGS04) を使用した。MRK に対する感受性評価のため viability assay を行い GBM 幹細胞の IC_{50} を算出した。MRK によるアポトーシス誘導効果を評価するため Annexin V-FITC を使用してフローサイトメトリーを行った。MRK による幹細胞形質の変化を評価するため sphere forming assay を行った。Notch シグナルの下流にある Akt シグナルを評価するため MRK 処理後のリン酸化 Akt の蛋白レベルの変化を western blot で確認し、MRK 感受性の Akt 依存度を myristoylated Akt ベクターを用いた rescue assay で検証した。さらにがん幹細胞マーカーである CD44 と CD133 の発現量をフローサイトメトリーで測定し MRK 感受性との相関解析を行った。

[結果] Viability assay より MRK は濃度依存性に全ての GBM 幹細胞株の生存率を減少させた。30R, 1123M, MD13, Me83, 528P, 157NS, 146NS, TGS01, TGS04 の MRK に対する IC_{50} は、順に 0.822 μ M, 0.659 μ M, 0.518 μ M, 1.193 μ M, 4.563 μ M, 3.17 μ M, 3.48 μ M, 1.874 μ M, 9.371 μ M であり、この結果から MRK への感受性は高感受性群 ($IC_{50} < 2 \mu$ M, $n = 5$) と低感受性群 ($IC_{50} > 3 \mu$ M, $n = 4$) に明確に分けられた。アポトーシス assay では、MRK は全ての GBM 幹細胞株に対しアポトーシスを誘導した。特に高感受性群は MRK 4 μ M 以下でアポトーシス細胞が著明に増加し、低感受性群では MRK 4 μ M もしくは 8 μ M でアポトーシスが有意に誘導された。Sphere forming assay では、濃度依存性に全ての GBM 幹細胞株の sphere 個数および大きさが抑制された。高感受性群では MRK 2 μ M で sphere 個数も大きさも著明に減少し MRK 3 μ M で完全に消失した。一方、低感受性群は MRK 8 μ M 以上で著明に減少した。MRK 処理後のリン酸化 Akt 発現レベルは高感受性群で濃度依存性に低下し、低感受性群への影響はわずかであった。Myristoylated Akt ベクターを用いた rescue assay では、viability assay, アポトーシス assay, sphere forming assay において MRK の効果を完全にはキャンセルすることができなかった。CD44 と CD133 の発現量に関し、MRK 高感受性群は順に 87.9 - 100%、0 - 33.4% であり、MRK 低感受性群は 0.24 - 87.7%、84.2 - 99.4% であった。GBM 幹細胞株に対する MRK の IC_{50} は CD44 の発現と負の相関関係 ($r = -0.865$, $P = 0.005$) を示し、CD133 の発現とは正の相関関係 ($r = 0.712$, $P = 0.037$) を示した。

[結語] GBM 患者由来の GBM 幹細胞に対する MRK の効果は高感受性群と低感受性群が分けられた。その効果は Akt シグナルの阻害程度に相関したが、Akt シグナルに完全に依存しているとは言えなかった。MRK は CD44 の発現量が高く、CD133 の発現量が高い GBM 幹細胞に有効であり CD44 および CD133 は感受性の指標になりうることを示唆された。