

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861262

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞に特異的に発現する分子の探索と治療標的分子としての妥当性評価

研究課題名(英文) The evaluation of target molecule in glioma stem-like cells

研究代表者

玉瀬 玲 (Tamase, Akira)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10595458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Tumor initiating cellで機能する分子としてNotchが抽出された。本研究では、膠芽腫患者由来の幹細胞株を使用し、Notchを阻害する分子標的薬剤MRK003 (MRK)の効果の評価した。使用した3種類の細胞株にはNotch1、2の発現が認められた。MRKによってNotchシグナルは阻害された。MRKの下流シグナルであるAKTシグナルが強く阻害された幹細胞株は低濃度のMRKにより細胞増殖、Sphere形成能が高度に低下し、AKTシグナル阻害が不変であった幹細胞株に対するMRKの効果は乏しかった。以上より、MRKはAKTシグナル阻害程度によって効果が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Notch was selected as an important signaling molecule for cancer stem/initiating cells to maintain stemness, induce cell proliferation and regulate apoptosis. Notch signal inhibition by -secretase inhibitor may be effective strategy for the treatment of cancer stem/initiating cells. We analyzed 3 patient's derived GBM stem-like cells with treatment by MRK003, a novel clinically available -secretase inhibitor. Notch 1 and 2 were expressed in all cells. MRK003 suppressed Notch signaling in all cells. Akt signaling which is downstream of Notch was strongly inhibited in two species of cells. These cells showed strong effect of MRK in terms of inhibition of proliferation and sphere formation. On the contrary, the cell without alteration of Akt signaling by MRK showed low effect of MRK. Taken together, the effect of MRK003 may depend on the inhibition of Akt pathway.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：グリオーマ幹細胞 Notch 分子標的療法 増殖

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫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加える集学的治療を行っても5年生存率は5%、平均生存期間は2年未満のことが多い。昨今の医療進歩による他臓器癌治療成績の改善を鑑みると、過去30年にわたり治療成績がほぼ不変である膠芽腫に対して新たな治療法の確立は最重要課題である。膠芽腫は周囲の正常脳組織へ浸潤して増大していく特徴があるため他臓器固形癌と異なり外科的完全切除は不可能である。そのため外科的切除後の残存膠芽腫制御のために新たな化学療法の確立が必須である。

近年のがん基礎研究では腫瘍の起源となる癌幹細胞の存在が提唱され、脳腫瘍においてもグリオーマ幹細胞がいち早く同定され、研究領域が急速に拡大している。

膠芽腫幹細胞で機能する分子として Notch シグナルが抽出された。Notch シグナルとは隣接する細胞間でのシグナル伝達システムであり、その主な機能は発生過程における幹細胞の維持制御だけでなく、増殖、アポトーシス制御、腫瘍形成能などにも関わっているシグナルである。さらに Notch シグナルが関与する下流シグナルは多数あるとされており、その中には膠芽腫の主要シグナルである細胞の生存や増殖に関与する AKT 経路も含まれている。従って Notch シグナルを制御することにより膠芽腫幹細胞を含めた様々な癌幹細胞を制御できる可能性がある。

Notch シグナル阻害剤とは一般に γ -セクレターゼ阻害剤のことを指す。膠芽腫においても γ -セクレターゼ阻害剤の抗腫瘍剤としての有効性が *in vitro*, *in vivo* で報告されている。Notch 阻害剤の中でも MRK003 (MRK) は強力な γ -セクレターゼ阻害作用を有する新規の化合物であり、基礎研究において T 細胞性白血病、乳癌、肺癌、膵臓癌、悪性黒色腫に対して強力な増殖抑制、アポトーシス促進効果が報告されている。

従って癌幹細胞の形質維持、増殖、アポトーシス制御に重要な Notch シグナルに着

目し、膠芽腫幹細胞に対する新規分子標的剤 MRK の抗腫瘍効果を評価するに至った。

2. 研究の目的

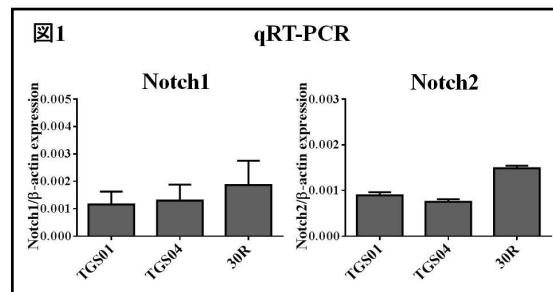
腫瘍幹細胞で機能する分子として Notch シグナルが抽出された。Notch シグナルは発生過程における幹細胞の維持制御を担っている。膠芽腫において Notch シグナルの異常および Notch シグナル阻害剤の抗腫瘍剤としての有効性が *in vitro* および *in vivo* で報告されている。Notch シグナルの細胞内活性化を担う γ -セクレターゼを阻害する分子標的薬剤 MRK003 (MRK) は Notch 阻害剤のなかでも最も強力であると言われている。本研究の目的は、膠芽腫患者由来の幹細胞株を使用し MRK の抗腫瘍効果を評価した。

3. 研究の方法

膠芽腫患者由来の3種類の膠芽腫幹細胞株を使用した。Notch 受容体の存在を定量的 RT-PCR で評価した。MRK による Notch シグナル阻害およびその下流シグナルである AKT シグナルの蛋白レベルを westernblotting で解析した。次に細胞増殖能評価のために MTT assay、幹細胞形質評価のために Sphere forming assay を行い、アポトーシス細胞の検出に AnnexinV-FITC を用いたフローサイトメトリーで評価した。

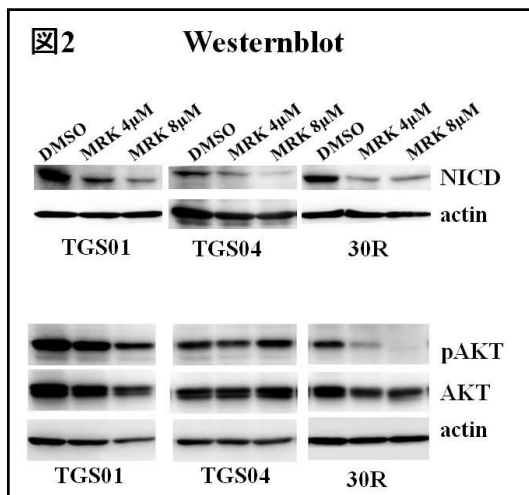
4. 研究成果

使用した3種類の膠芽腫幹細胞株は定量的 RT-PCR より Notch1, Notch2 の発現が認められた。これらの発現レベルは3種とも異なっていた。(図1)

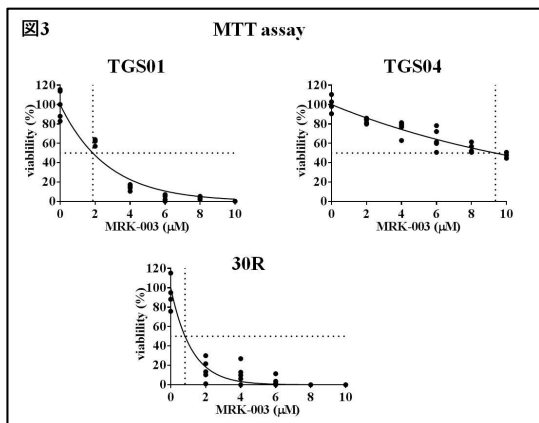


MRK によって Notch シグナルの細胞内活性化を示す cleaved Notch intracellular domain (NICD) は阻害された。この結果よ

り MRK は Notch シグナル阻害剤であることが確認された。その下流シグナルの一つである AKT シグナルに関して、2 種類の幹細胞株は強く阻害され、残り 1 種の幹細胞株はほとんど阻害されなかった。Notch シグナル阻害程度と AKT シグナル阻害程度に明らかな相関は認めなかった。(図 2)

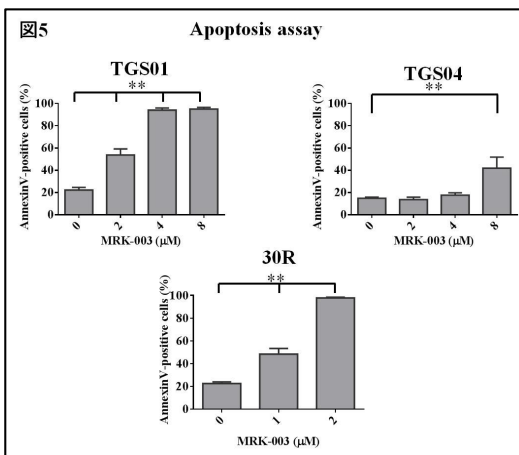
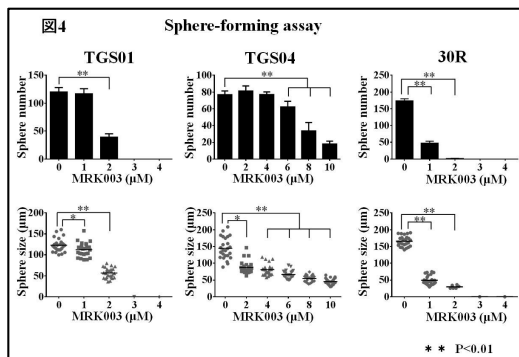


MRK は 3 種類の膠芽腫幹細胞の細胞増殖、sphere 形成能を抑制し、アポトーシスを促進した。2 種類の膠芽腫幹細胞株 (TGS01、30R) は、低濃度 (2μM 以下) MRK で強い効果を認めた。残り 1 つの膠芽腫幹細胞株 (TGS04) は、高濃度 (8μM 以上) で強い効果が認められたが sphere の大きさについては濃度依存性に低下した。(図 3、4、5)



以上の結果から、患者由来膠芽腫幹細胞株は、Notch シグナル阻害剤 MRK によって細胞増殖抑制、幹細胞形質維持の抑制、アポトーシス促進が誘導された。MRK の効果は、AKT シグナルが強く阻害される膠芽腫幹細胞に強い効果を示した。MRK は Notch シグナルの活性化指標である NICD の阻害程度ではなく、その下流である AKT シグナルの

阻害程度によって強度が規定される可能性が示唆された。



Notch シグナルの下流には様々なシグナルが関与し、各細胞背景によっても異なっている。本研究は、膠芽腫幹細胞における Notch シグナルと AKT シグナルとの関連を示す結果となった。今後も、膠芽腫幹細胞において Notch シグナルとその下流シグナルとの分子機構を探究する予定である。

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 4 件)

1. Miyaji Y, Kawabata Y, Joki H, Seki S, Mori K, Kamide T, Tamase A, Nomura M, Kitamura Y, Tanaka F. High-resolution magnetic resonance imaging findings of basilar artery plaque in a patient with branch atheromatous disease; a case report, *J Med Case Rep* 8:395, 2014 査読有
2. Kawabata Y, Miyagi Y, Joki H, Seki S, Mori K., Kamide T, Tamase A, Nomura M, Kitamura Y, Tanaka F. Isolated index finger palsy due to cortical infarction. *J stroke Cerebrovasc Dis* 23:e475-6, 2014 査読有
3. Tamase A, Kamide T, Mori K, Kitamura Y,

Shima H, Seki S, Nomura M. Cerebellar hemorrhage after embolization of ruptured vertebral dissecting aneurysm proximal to PICA including parent artery. *Surg Neurol Int*, 5;59,2014 査読有

4. Nomura M, Miyashita K, Tamase A, Kamide T, Mori K, Kitamura Y, Seki S, Shima H, Yanagimoto K. A chronic intracerebral fluid hematoma. *Neuroradiol J*, 27;191-4,2014 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. 玉瀬 玲、笹目 丈、関 俊輔、上出 智也、野村 素弘、北村 佳久
頸動脈ステント留置術後の造影剤腎症 - 当院の経験
第 72 回日本脳神経外科学会総会、平成 25 年 10 月 16 日-18 日、パシフィコ横浜 (神奈川)
2. 玉瀬 玲、森 健太郎、宮地 洋輔、三富睦美、島 浩史、野村 素弘、北村 佳久
神経心理検査を用いた脳出血後の正常圧水頭症に対する髄液排出試験
第 38 日本脳卒中学会総会、平成 25 年 3 月 21 日-23 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京)
3. 玉瀬 玲、森 健太郎、宮地 洋輔、三富睦美、島 浩史、野村 素弘、北村 佳久
失語で発症した脳卒中後の痙攣発作の初期診断における MRI ASL 法の有用性
第 38 日本脳卒中学会総会、平成 25 年 3 月 21 日-23 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉瀬 玲 (TAMASE AKIRA)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：10595458

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし