

平成 25 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	トランスポゾン誘導型膠芽腫モデルを用いた Lgr5 陽性細胞の特性と新規治療標的の解明	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部 細菌学教室 藤田 貢	

1. 研究目的・内容

本研究では **Sleeping Beauty** トランスポゾン誘導型マウス膠芽腫モデルを用い、**Lgr5** 陽性膠芽腫細胞を誘導・樹立した。それらの細胞を用い、膠芽腫の薬剤耐性機構の解明を試みた。特に **ATP** 結合カセット輸送体 (**ATP-binding cassette transporters; ABC** 輸送体) に注目し、研究をすすめた。

2. 研究経過及び成果

近年の治療技術革新によりグリオーマの治療成績は向上しており、特にテモゾロミドの出現が治療成績向上に貢献している。しかし今なお悪性グリオーマの予後は不良である。グリオーマ治療抵抗性については腫瘍細胞の薬剤耐性が放射線治療抵抗性と並び重要な因子であるとされる。特に前者について、癌幹細胞が薬剤耐性機構に重要な働きをすることが示され、さらに近年の研究により、**ABC** 輸送体が細胞の多剤薬剤耐性機序に重要な働きをしていることが明らかとなった。そこで、グリオーマ幹細胞においても**ABC** 輸送タンパクが薬剤耐性機序に関与しており、それを阻害することでグリオーマ幹細胞の薬剤感受性を向上させようと推測し、本研究にてこれの検証を試みた。

マウス脳内に自発発生型グリオーマを発生させ、その腫瘍組織から **Lgr5** をマーカーとしてグリオーマ幹細胞を分離・誘導した。これら幹細胞でのテモゾロミド感受性を **in vitro** および **in vivo** で評価した。さらに **siRNA** を用いてグリオーマ幹細胞内の **ABC** 輸送タンパク発現を抑制し、テモダール感受性における **ABC** 輸送タンパクの影響度を再評価した。また、サイドポピュレーション解析を用いて、細胞の薬剤排出能の評価も行った。さらに、テモゾロミド高感受性幹細胞では細胞接着あるいは細胞遊走に異常を来していると考え、我々がすでに確立しているケモカインに関する評価系を用いて、各種ケモカイン受容体および対応するケモカインリガンドを網羅的に測定した。

分子構造解析により、**ABC** 輸送タンパクとテモゾロミドは細胞質側で結合しうることが示された。また **ABC** 輸送体発現量はグリオーマ幹細胞において親細胞株と比べて有意に高値であった。**ABC** 輸送体遺伝子を欠損させたグリオーマ幹細胞では **in vitro** および **in vivo** の双方で同様の有意なテモダール感受性上昇を示した。また、誘導されたスフェロイド形成細胞はグリオーマ幹細胞としての性質をもち、かつテモゾロミド抵抗性であることがわかった。このスフェロイド形成細胞はサイドポピュレーションとよばれる薬剤排出能の高い細胞が豊富であることも示された。このサイドポピュレーション解析により、テモゾロミドと **ABC** トランスポーターとの相互作用はありそうだと推測された。さらに各種ケモカイン受容体および対応するリガンドを測定した結果、テモゾロミド高感受性幹細胞ではいくつかのケモカインループに異常をきたしており、それがスフェロイド形成不全の一因であると示唆された。

本研究により、グリオーマ薬物治療抵抗性には、グリオーマ幹細胞に高発現する **ABC** 輸送体タンパクが重要な働きをしていることが示唆された。またグリオーマ幹細胞が腫瘍形成能を失うメカニズムとして、ケモカイン系の関与が示唆された。テモゾロミドによる治療成績向上には、グリオーマ幹細胞に発現する薬剤排出分子を標的とした新規治療法が必要と考えられた。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

テモゾロミドによるグリオーマ治療成績向上にはグリオーマ幹細胞に発現する薬剤排出分子ないしはグリオーマ幹細胞同士の相互作用を標的とした新規治療法の可能性が示唆される。よって、テモゾロミドに特異的な薬剤排出分子の検索が今後の課題である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
第72回日本脳神経外科学会	口頭	2012-11
第30回日本脳腫瘍学会	口頭	2013-10
BMC Cancer	雑誌	2014