平成２５年４月１９日提出

対象研究テーマ：がん幹細胞を標的とした薬剤スクリーニング法の開発に関する研究

研　究　期　間：2012 年 4 月 1 日～2013 年 3 月 31 日
研　究　題　目：Notch シグナルを標的としたグリオーマ幹細胞の制御

研 究 代 表 者：金沢大学医薬保健研究域医学系　助教　中田光俊

研究成果の概要：
本研究では、膠芽腫患者由来の 9 種類の膠芽腫幹細胞株を使用し Notch 阻害剤であるγ-セクレターゼ阻害剤(MRK-003 以後 MRK)の有効性を *in vitro* で評価した。MRK により膠芽腫幹細胞の細胞増殖抑制、アポトーシス促進、幹細胞形質の喪失を認めた。膠芽腫幹細胞株には MRK 高感受性群と低感受性群が存在した。CD44 の発現量が高く、CD133 の発現量が低い膠芽腫幹細胞様細胞に MRK は有効であり CD44 および CD133 発現量は Notch 阻害剤感受性のバイオマーカーになりうると考えられた。

研究分野：脳腫瘍学
キーワード：グリオーマ、分子標的療法、グリオーマ幹細胞、Notch、増殖、浸潤

１．研究開始当初の背景
近年の医療技術の進歩によりヒトがんの予後は急速に改善している。しかしながら悪性グリオーマの悲惨な治療成績は 30 年以上前からほとんど変わっていない。悪性グリオーマは周囲の正常脳に対して浸潤性に増殖する特徴があり、ヒトとしての高次機能を司る脳という臓器の性質を踏まえた時、手術で全部摘出することは不可能である。とりわけ本腫瘍の予後を改善させるには新たな化学療法薬剤の開発が急務であると言える。
グリオーマ細胞形質の維持に関与している複数のシグナル伝達経路がこれまでの基礎研究により明らかとなっている。Notch シグナルは幹細胞の発生・分化に関わることが公知であり、特に神経幹細胞の維持には Notch が必須である。近年、悪性グリオーマ内には腫瘍幹細胞が存在し腫瘍形成の根源であるとするがん幹細胞仮説が提唱され、研究領域が急速に拡大している。これまでに Notch シグナルが悪性グリオーマ幹細胞においてもその発生シグナルとして機能していることが証明されている。さらに近年 Notch シグナルはグリオーマの浸潤に関与していることが報告された。このことから Notch はグリオーマ細胞の格好の標的分子であることが予想される。

２．研究の目的
本研究プロジェクトの目的は、「グリオーマ幹細胞のシグナル伝達を担う Notch を阻害することによりグリオーマの制御は可能である」との仮説に基づき、いまだヒトがんに対して臨床応用されていない Notch の新規経口分子標的薬剤 MRK003 を使用し *in vitro, in vivo* の実験結果から臨床応用への可能性を探ることにある。

３．研究の方法
9 種類の膠芽腫幹細胞株を使用した。MRK 処理後の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による解析を行った。また、癌幹細胞マーカーである CD44 と CD133 の発現量計測はフローサイトメトリーを用いた。

４．研究成果
下記の 5 点を明らかにした。
１、MTT assay の結果から、膠芽腫患者由来の 9 種類の膠芽腫幹細胞様細胞は MRK003 に対する感受性評価により高感受性細胞群（A 群）5 種類と低感受性細胞群（B 群）4 種類に分けられた。
２、Sphere forming assay では、低濃度の MRK003 により A 群では sphere 形成が阻害され、B 群では高濃度の MRK003 で sphere 形成能が阻害された。
３、AnnexinV-FITC を用いたフローサイトメトリーでは A 群で低濃度の MRK003 によりアポトーシスが誘導された。

４、CD44 と CD133 の発現量は、A 群ではそれぞれ 87.9-100%、0-33.4%であり、B 群では 0.24-87.7%、84.2-99.4%であった。
５、CD44 および CD133 の発現量と MRK003 に対する IC50 に有意な相関関係が認められた。

以上より、ヒト膠芽腫由来の膠芽腫幹細胞には Notch 阻害剤高感受性群と低感受性群が存在した。Notch 阻害剤は CD44 の発現量が高く、CD133 の発現量が低い膠芽腫幹細胞に有効であり CD44 および CD133 発現量は Notch 阻害剤感受性のバイオマーカーになりうると考えられた。
近年、がん幹細胞を標的とする新たな治療法が模索されている。また、がん治療は個別化の方向へ向かっている。手術検体から CD44 および CD133 の発現量を調べ、膠芽腫幹細胞を狙って Notch 阻害剤を使用する個別化療法は画期的なグリオーマ治療につながる可能性があると考えられる。

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 3 件）
1. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, Hirao A, Hamada JI.
Integrin α3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion.
Br J Cancer, in press 査読有

2. Jin R, Nakada M, Teng L, Furuta T, Sabit H, Hayashi Y, Demuth T, Hirao A, Sato H, Zhao G, Hamada JI.
Combination therapy using Notch and Akt inhibitors is effective for suppressing invasion but not proliferation in glioma cells.
Neuroscience letters 534: 316-321, 2012 査読有

3. Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada JI
The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma
Frontiers in Radiation Oncology 2: 98, 2012 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）
中田光俊、金日華、滕雷、古田拓也、淑瑠ヘムラサビット、林裕、佐藤博、濵田潤一郎
膠芽腫細胞株に対する Akt 阻害剤と Notch 阻害剤の併用効果
第 13 回日本分子脳神経外科学会，平成 22 年 9 月 20 日-21 日，熊本

〔図書〕（計 1 件）
Nakada M, Kita D, Teng L, Pyko IV, Watanabe T, Hayashi Y, Hamada JI.
Receptor tyrosine kinases: principles and functions in glioma invasion
Advances in Experimental Medicine and Biology 986:143-70, 2013

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
中田光俊、田中慎吾、平尾敦、濵田潤一郎
Notch シグナルを標的としたグリオーマ幹細胞の制御
平成 24 年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点研究成果報告会，平成 24 年 12 月 18 日，角間

６．研究組織
(1)研究代表者
金沢大学医薬保健研究域医学系・助教
中田光俊

(2)研究分担者
金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生
田中慎吾

(3)本研究所担当者
遺伝子・染色体構築・教授　平尾　敦