

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

悪性グリオーマに対する放射線増感による新規治療法の開発

研究代表者 三島 一彦 (国際医療センター 脳神経外科)

研究分担者 深田 淳一*

研究背景

悪性神経膠腫(グリオーマ)は脳腫瘍の中で、最も治療困難かつ予後不良な腫瘍である。悪性グリオーマの中でも膠芽腫は特に予後不良であり、放射線治療と化学療法剤テモゾロミドの併用による標準治療を行なっても、生存期間中央値が1.5年程度、5年生存割合は10%以下であり、腫瘍再発を免れない。悪性グリオーマが予後不良である理由として、治療の中心的役割を果たす放射線治療に対して腫瘍が抵抗性を示すことが挙げられる。グリオーマは様々な遺伝子異常の蓄積により悪性化することが知られている。なかでも頻度の高い遺伝子異常が上皮増殖因子受容体: Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子の変異であり、EGFR蛋白の量的質的な発現異常が生じ、EGFR細胞外ドメインを欠失したmutant EGFR (EGFRvIII) が悪性グリオーマの約40%で高発現している。このEGFRvIIIはグリオーマで恒常的に活性化しており腫瘍形成や浸潤に関与しているほか、放射線治療抵抗性にも関係していることが示唆されている。すなわちEGFRvIIIを発現するグリオーマ細胞は、これを発現しないグリオーマ細胞に比べ放射線治療抵抗性であることが報告されている。また悪性グリオーマ細胞の中で自己複製能と多分化能、そして強い腫瘍形成能を有するグリオーマ幹細胞の存在が注目されているが、このグリオーマ幹細胞が放射線治療抵抗性を示すことも示唆されている。グリオーマ細胞の中にはこのように放射線治療抵抗性を示す複数の細胞群が存在するため、再発・治療抵抗性の原因となることが考えられる。

一方、腫瘍細胞に対する放射線の効果はDNA損傷により引き起こされ、DNA損傷が修復されないと細胞死が誘導される。放射線によるDNAの2重鎖切断(DSB)に対して修復の反応する経路の中で、MRE11-RAD50-NBS1(MRN)は複合体を作り、DNAの損傷を最初に認識するセンサーとして機能すると考えられている。MRN複合体はDNAの2重鎖切断部位へ最初に集積されると同時に、毛細血管拡張性運動失調症(AT)の原因遺伝子産物である

*慶應義塾大学医学部 放射線科学教室

ATMをDSB部位へ誘導する。ATMはMRN複合体依存的に活性化され、活性化したATMは下流に位置する様々な分子をリン酸化することによって生体のDNA損傷に対応する細胞周期チェックポイント機構が働き始める。従ってMRN-ATM系の働きを抑制することによりDNA損傷の修復を阻害し、放射線治療感受性を増強する効果が期待される。最近ATMを阻害する低分子化合物が膠芽腫細胞に対して放射線効果を増強し、さらに腫瘍浸潤能を抑制する効果もあることが報告された。そこで放射線治療に抵抗性を示す悪性グリオーマ細胞に対してATMより上流に位置するMRN複合体の機能を阻害することで、より強い放射線治療増感効果が期待される。さらに放射線増感作用を持つ薬剤をいかに腫瘍細胞特異的に導入するかが放射線治療抵抗性克服への重要な課題である。

研究目的

悪性グリオーマが治療困難である理由として悪性グリオーマ細胞が放射線照射に抵抗性を示すことがあげられ、予後の改善には、放射線抵抗性の克服が必須である。本研究では放射線照射によるDNAの2重鎖切断(DSB)を修復する経路の中で最初に機能するMRNを抑制することでDNA損傷の修復を阻害し放射線治療増感効果がみられるかを検討した。またグリオーマ摘出術に蛍光診断薬として用いられる光感受性物質: 5アミノレブリン酸(5-ALA)の代謝物であるプロトポルフィリンIX(PpIX)が悪性グリオーマ細胞内に特異的に蓄積することを利用し、「PpIXが放射線増感作用をもてば悪性グリオーマ細胞を標的とした治療が可能である」という仮説のもと、悪性グリオーマ細胞の放射線増感を目指した新たな治療法の開発を目的とした。

材料と方法

1) 細胞株、培養

ヒト悪性グリオーマ細胞株: U251, LN229, LN428は10% FBS添加DMEM培養液で、ヒト線維芽細胞AG1522は15% FBS添加EME培養液で37℃、5% CO₂下で培養した。MirinはSigma社(St. Louis, MO)より入手した。

細胞への照射はMBR-1520R照射装置 (Hitachi Medical) を用い2 Gy/分で行った。

2) 細胞生存アッセイ

96 wellのプレートを用い各wellに5000個の細胞を培養し, Mirinを10, 25, 50あるいは100 μM 濃度で3時間処理後, CCK-8 assayキット (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて行った。

3) Clonogenic survival assay

悪性グリオーマ細胞を10 cm dishに24時間培養後, Mirinをそれぞれ10, 25, 50あるいは100 μM で投与し3時間培養後, Mirinを除去して細胞を14日間培養した。コントロールはMirinの代わりにDMSOを添加し同様の処理を行った。

4) 細胞周期

10 cm dishに悪性グリオーマ細胞を培養し, Mirin (25 μM) を投与し3時間後に4 Gyで照射し48時間後に細胞を集め70%エタノールで固定した。Propidium iodide (PI) で染色した細胞をGallios™ (Beckman Coulter, Brea CA, USA) FACScanで測定し, Kaluza v1.3 (Beckman Coulter, Brea CA, USA) で解析した。

5) Annexin V-PIアポトーシス アッセイ

10 cm dishに悪性グリオーマ細胞を培養し, Mirin (25 μM) を投与し3時間後に4 Gy照射し48時間後に接着細胞と浮遊細胞を集めPBSで洗浄後binding bufferに浮遊させ, Annexin V-FITC (BioVision, Milpitas, CA) とPIを15分反応させ, FACScanでAnnexin V FITC陽性細胞を測定した。

6) Mitotic catastropheの検出

悪性グリオーマ細胞をLab-Tek Chamberスライド上に培養し, Mirin (25 μM) の投与3時間後, 4 Gyで照射し72時間後に細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後, DAPI染色を行い, 蛍光顕微鏡下で2核以上の多核細胞数を計測した。

結果

1) MRN阻害剤: Mirinによるグリオーマ細胞増殖抑制効果

3種類のヒト悪性グリオーマ細胞株: U251, LN229, LN428と正常ヒト線維芽細胞株: AG1522にMirinを0~100 μM で添加し各細胞の生存率をみた。Mirin: 25 μM で線維芽細胞の生存は抑制されず, 一方Mirin: 25 μM ですべての悪性グリオーマ細胞株において生存率は82-84%と有意に抑制された(図1)。

2) グリオーマ細胞に対するMirinの放射線増感作用

1)の実験結果をもとに, 25 μM 濃度のMirinを各悪性グリオーマ細胞に3時間作用させ, その後放射線を照射しコロニー形成能を検討した。その結果, Mirinで処理し放射線照射を行なうと, 照射単独に比べいずれの悪性グリオーマ細胞株においてもコロニー形成能が有意に抑制された(図2)。

3) 悪性グリオーマ細胞に対するMirinと照射によるアポトーシスの誘導

いずれの悪性グリオーマ細胞株に対しても, Mirin単独投与, 照射単独に比較し, Mirinと照射の併用によりアポトーシスが有意に誘導された(図3)。

4) 悪性グリオーマ細胞に対するMirinと照射による細胞周期の検討, mitotic catastropheの誘導

いずれの悪性グリオーマ細胞株においても, Mirinと照射併用により, Mirin単独, 照射単独に比較し, G2/M期に細胞が集積した(図4)。

またMitotic catastropheに陥った細胞がMirinや照射単独に比べMirinと照射併用により有意に増加した(図5)。

考察

MRNを阻害する低分子化合物(Mirin)は悪性グリオーマ細胞に対して有効な放射線増感剤となることが確認された。その機序として, 細胞周期の停止, アポトーシスの誘導, Mitotic catastropheの誘導が考えられた。以上よりMRNは悪性グリオーマの放射線治療抵抗性克服につながる新たな治療標的分子となる可能性が示唆された。腫瘍細胞特異的に放射線増感作用を持つ薬剤をいかに導入するかが次なる課題であり, 我々は光感受性物質:

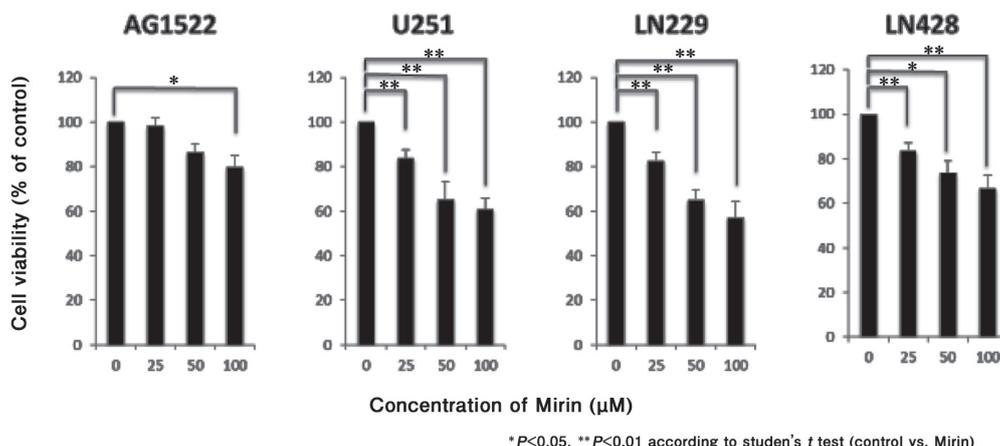


図 1.

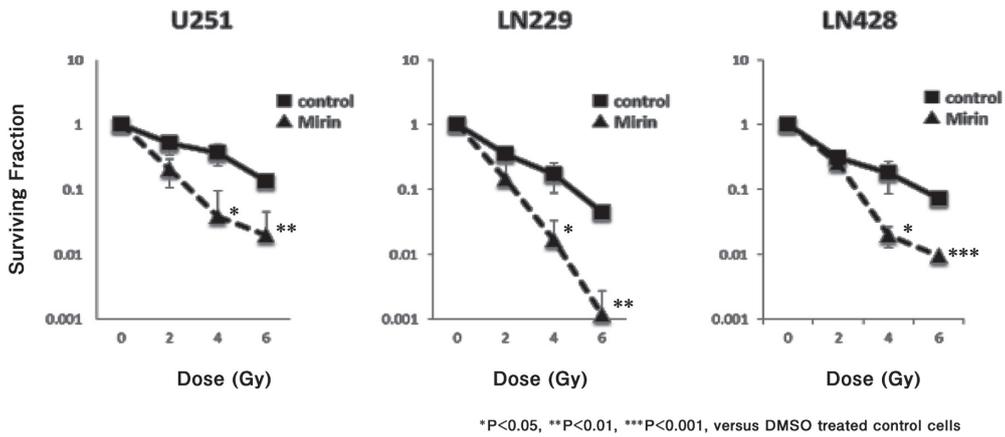


図 2.

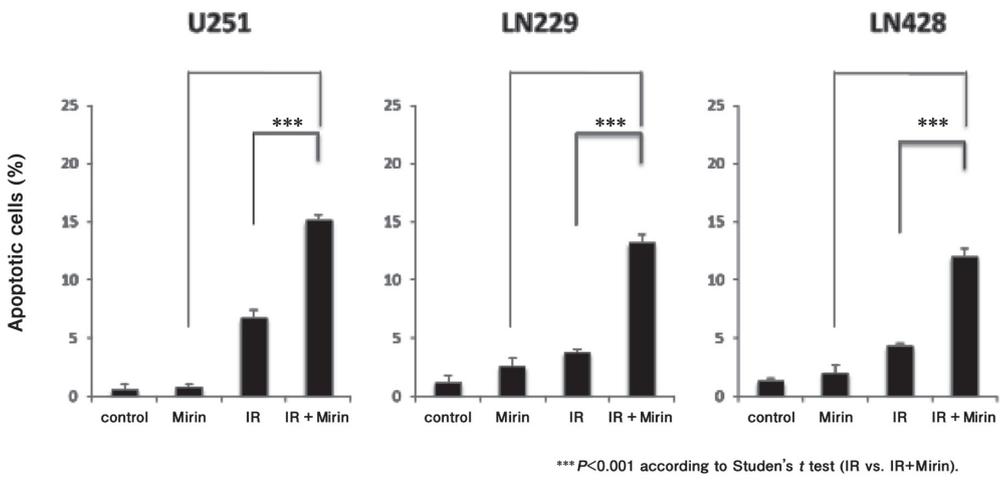


図 3.

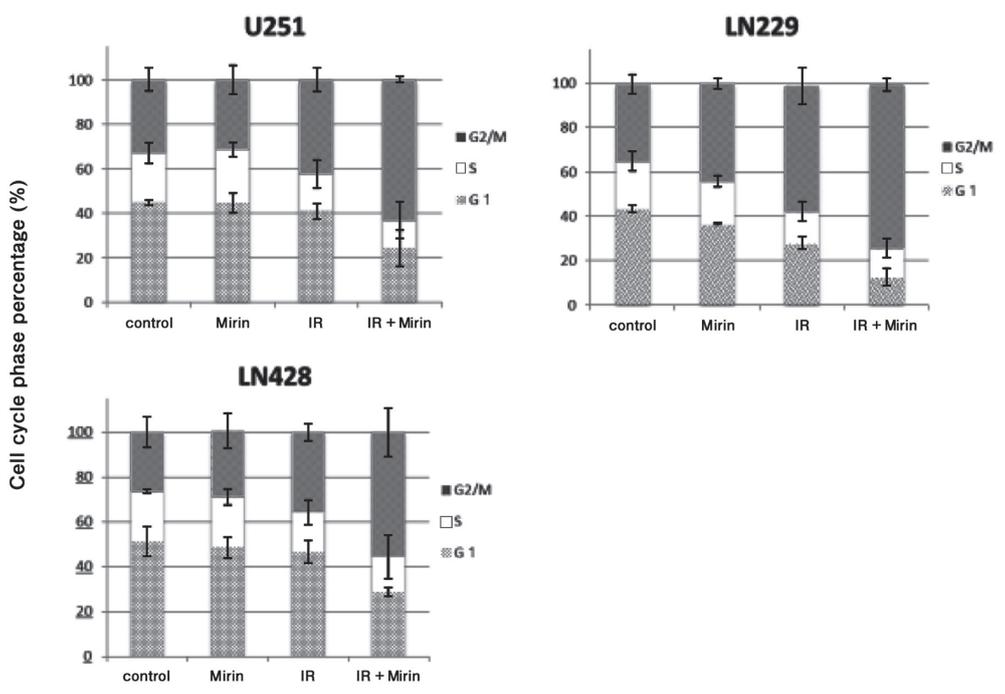


図 4.

5-ALAに注目した。悪性グリオーマ摘出術に蛍光診断薬として用いられる5-ALAは、その代謝物であるPpIXが悪性グリオーマ細胞内に特異的に蓄積することを利用して、PpIXが放射線増感作用をもてば、正常脳組織への障害を少なく、かつ悪性グリオーマ細胞を標的とした治療が可能であると考えられる。そこで5-ALAによる悪性グリオーマ細胞を標的とした放射線治療効果の増強を目指した新たな治療法の開発に着手している。Preliminaryな結果ではあるが、5-ALAをグリオーマ培養細胞株に

投与した後に照射を行うと、照射単独に比べコロニー形成能が強く抑制されることが示され、5-ALAは放射線増感作用をもつことが確認された(図6)。今後はさらに5-ALAの放射線増感作用のメカニズムについて検討する予定である。

謝 辞

本研究は平成27年度埼玉医科大学学内グラントにより行われた。

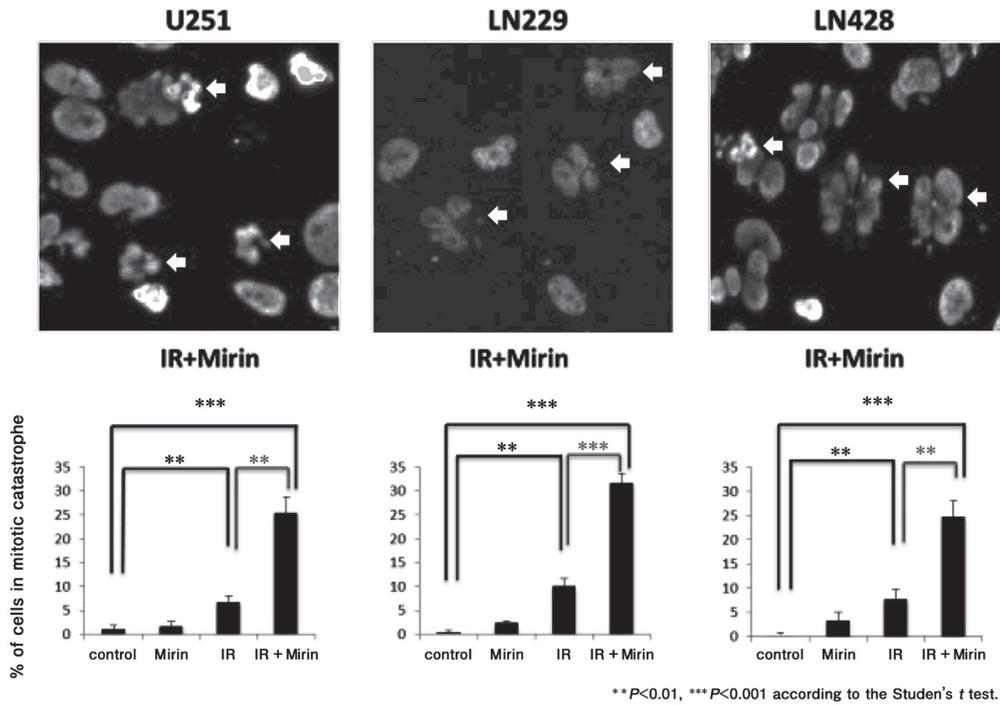


図 5.

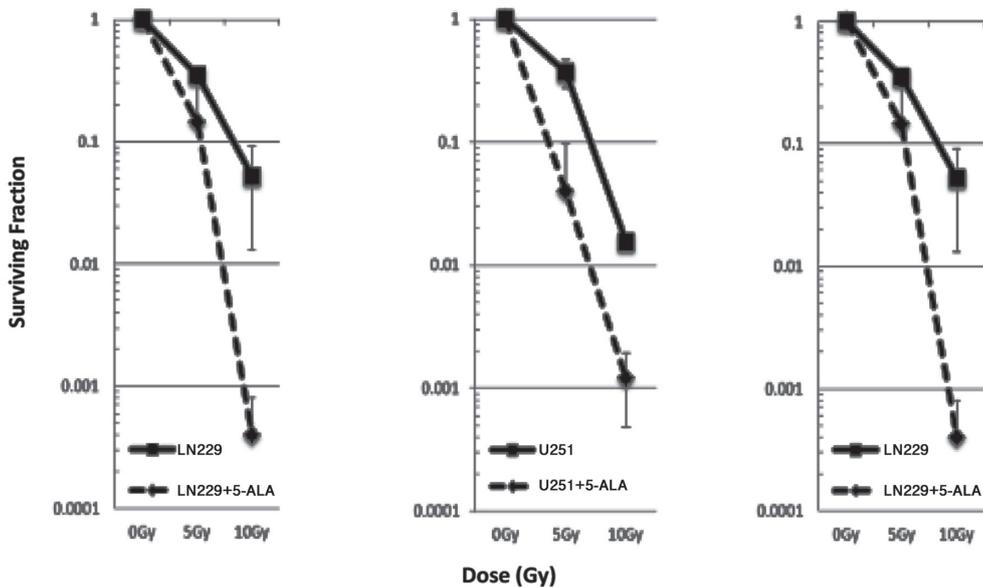


図 6.

研究成果リスト

論文

- 1) 三島一彦. 中枢神経系原発悪性リンパ腫, リンパ腫学, 日本臨床 2015; 73: 585-96.
- 2) Fukuoka K, Yanagisawa T, Watanabe Y, Suzuki T, Shirahata M, Adachi J, Mishima K, Fujimaki T, Matsutani M, Wada S, Sasaki A, Nishikawa R. Brainstem oligodendroglial tumors in children: two case reports and review of literatures. Childs Nerv Syst 2015; 31(3): 449-55.
- 3) Fukuoka K, Yanagisawa T, Suzuki T, Shirahata M, Adachi JI, Mishima K, Fujimaki T, Matsutani M, Nishikawa R. Malignant transformation of germinoma 14 years after onset: Favorable efficacy of oral etoposide. Pediatr Int 2015; 57: 483-6.
- 4) Ishihara H, Ishihara S, Niimi J, Neki H, Kakehi Y, Yemiya N, Kohyama S, Yamane F, Kato H, Suzuki T, Adachi JI, Mishima K, Nishikawa R. The safety and efficacy of preoperative embolization of meningioma with N-butyl cyanoacrylate. Interv Neuroradiol 2015; 5: 624-30.
- 5) Sutani S, Ohashi T, Sakayori M, Kaneda T, Yamashita S, Momma T, Hanada T, Shiraishi Y, Fukada J, Oya M,

Shigematsu N. Comparison of genitourinary and gastrointestinal toxicity among four radiotherapy modalities for prostate cancer: Conventional radiotherapy, intensity-modulated radiotherapy, and permanent iodine-125 implantation with or without external beam radiotherapy. Radiother Oncol 2015; 117: 270-6.

学会発表

- 1) 三島一彦. 悪性神経膠腫手術時のBCNU wafers留置における留置点と使用経験, 第10回脳腫瘍の基礎シンポジウム, 特別講演, 2015年4月25日, 東京
- 2) 三島一彦, 鈴木智成, 安達淳一, 佐藤大樹, 塚越瑛介, 内田栄太, 藤巻高光, 西川 亮. 高齢者中枢神経悪性リンパ腫に対する導入免疫化学療法と維持化学療法による照射を回避した治療戦略と課題, 日本脳神経外科学会第74回学術集会, シンポジウム, 2015年10月14日, 札幌
- 3) 三島一彦, 安達淳一, 鈴木智成, 内田栄太, 石田譲治, 佐藤大樹, 塚越瑛介, 藤巻高光, 西川 亮. 高齢者中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する照射を回避した治療戦略, 第33回日本脳腫瘍学会学術集会, 口演, 2015年12月8日, 京都