

学位論文抄録

タンパク質導入法によるグリオーマ幹細胞の細胞死誘導と
その分子メカニズムについての検討
(Molecular mechanism on induction of cell death of glioma-initiating cells
by protein transduction therapy)

植 田 裕

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻脳神経外科学

指導教員

倉津 純一 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻脳神経外科学

富澤 一仁 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子生理学

学位論文抄録

[目的] グリオーマのうち最も悪性度の高いグリオブラストーマは、放射線治療や化学療法に抵抗性で、その平均生存期間は14か月と予後不良である。グリオブラストーマにはグリオーマ幹細胞が存在し、治療抵抗性に関与していることが示唆されているが、同細胞に対する有効な治療法は無い。タンパク質導入法とは、主に塩基性アミノ酸から成る膜透過性ペプチドと呼ばれるペプチドをタンパク質やペプチドに付加することにより細胞内に導入する技術である。癌抑制遺伝子 p53 の翻訳産物である p53 タンパク質のカルボキシル末端 (C 末端) ペプチドは、癌細胞増殖抑制とアポトーシスの誘導効果がある。膜透過性ペプチドの1種であるフロックスハウスイルス (FHV) 由来ペプチドに p53 タンパク質の C 末端ペプチドならびに膜透過促進ペプチド (Pas) を付加したペプチドを右旋性光学異性体 (D 体) で合成したペプチド (dPasFHV-p53C') は、グリオーマ細胞のアポトーシス促進作用を有する。しかし、同ペプチドのグリオーマ幹細胞に対する効果は不明である。そこで、当研究では dPasFHV-p53C' のグリオーマ幹細胞に対する効果について検証した。

[方法] グリオブラストーマ患者よりヒトグリオーマ幹細胞株を樹立した。dPasFHV-p53C' ならびにコントロールペプチドは、ペプチド固相合成法で合成した。細胞増殖は WST-8 アッセイで測定した。アポトーシスは TUNEL アッセイで検出し、オートファジーは LC3 の免疫染色とウェスタンブロッティングによる LC3-II の定量で検出し、オートファゴソームの観察は電子顕微鏡を用いた。オートファジーの阻害には Atg5 の siRNA を用いた。グリオブラストーマモデルマウスは、 1×10^3 個のヒトグリオーマ幹細胞をヌードマウスの線条体に移植し、作製した。in vivo でのペプチドの効果は、グリオブラストーマモデルマウスを用いて生存期間を、また皮下移植モデルを用いて腫瘍抑制効果を検討した。

[結果] dPasFHV-p53C' はグリオーマ幹細胞に効率良く導入された。また、濃度依存的にグリオーマ幹細胞の増殖抑制効果を示し、 $10 \mu\text{M}$ では完全に増殖を抑制した。dPasFHV-p53C' はグリオーマ幹細胞の細胞死を誘導するが、アポトーシスではなくオートファジーを介した細胞死であった。グリオーマ幹細胞のオートファジーを阻害すると、dPasFHV-p53C' の細胞増殖抑制効果が増強された。p53C' ペプチドを付加していない dPasFHV もグリオーマ幹細胞のオートファジーを誘導した。dPasFHV-p53C' はマウス移植モデルにおいてマウスの生存率を向上させ、皮下移植モデルで腫瘍増大を抑制した。

[考察] dPasFHV-p53C' はグリオーマ幹細胞にも増殖抑制効果を示したが、その機序はグリオーマ細胞に対するものと異なり、オートファジーを介した細胞死によるものであった。通常、グリオーマ幹細胞は、オートファジーを誘導することにより放射線治療や化学療法に対し抵抗性を示すと考えられている。しかし dPasFHV-p53C' や dPasFHV で処理したグリオーマ幹細胞では、オートファゴソームの蓄積が観察されたことから、これらペプチドはオートファゴソームとライソゾームの融合を阻害することでオートファジーを介した細胞死を引き起こすことが推測された。

[結論] dPasFHV-p53C' はグリオーマ幹細胞のオートファジーを介した細胞死を誘導することが明らかとなった。dPasFHV-p53C' を用いたタンパク質導入法は、グリオーマ幹細胞を標的とした新たな治療法として期待されることが示唆された。