



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	膠芽腫の放射線抵抗性における低分子量GTPase Rabの役割に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	西岡, 蒼一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医理工学)
Dissertation Number	甲第15037号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86134
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Soichiro_Nishioka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医理工学） 氏 名 西岡 蒼一郎

学 位 論 文 題 名

膠芽腫の放射線抵抗性における低分子量 GTPase Rab の役割に関する研究
(Studies on the roles of small GTPase Rab in the radioresistance of glioblastoma)

【背景と目的】 膠芽腫は最も高頻度な原発性脳腫瘍であり、非常に悪性度が高い。膠芽腫の治療には、手術後に化学療法と放射線療法が施される。膠芽腫の治療法および予後は少しずつ改善しているが、依然として予後は悪く、5年生存率は10%未満である。放射線治療は局所制御と生存率の上昇のために使用されるが、多くの場合において残存した膠芽腫細胞が増殖して再発する。治療効果を向上させるための標的の探索においては、治療抵抗性の分子メカニズムを理解することが肝要である。放射線に対する抵抗性の一因として考えられているのが、小胞輸送である。膠芽腫における放射線治療後の小胞輸送の制御と放射線抵抗性との関係は解明されていない。これを明らかにすることは、膠芽腫における放射線抵抗性のメカニズムを知る手がかりになりうる。Rab タンパク質群は細胞内小胞輸送を制御する Ras 様低分子 GTPase のサブファミリーである。Rab ファミリーには 70 以上のアイソフォームが存在し、そのうち様々なものが複数のがん種において、腫瘍の形成や成長、進展に促進的な役割を果たすことが知られている。しかしながら、放射線照射後における Rab タンパク質の役割については不明な点が多い。そこで本研究では、放射線照射後における Rab の役割を検討することを目的とした。**【材料と方法】** American Type Culture Collection (ATCC) から神経膠腫、膠芽腫細胞株を入手した。X 線照射を受けた膠芽腫細胞株 U87MG 細胞における Rab 遺伝子の発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析し、非照射細胞と比較した。放射線照射を受けた細胞における mRNA やタンパク質の発現を Real-time PCR やウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色により解析した。shRNA を組み込むことにより、特定のタンパク質の発現を抑制した細胞を構築した。放射線照射後のアポトーシス誘導を Annexin-V 染色により、細胞生存率を細胞数カウントやコロニーフォーメーションアッセイによりそれぞれ解析した。膠芽腫細胞における標的タンパク質の抑制による効果を生体内で検討するために、マウス脳腫瘍モデルを用いて X 線照射後の腫瘍の成長やマウスの生存期間を測定した。The Cancer Genome Atlas (TCGA) より入手した脳腫瘍患者データの解析により、タンパク質発現や予後との相関を解析した。Immunohistochemistry により、上記のマウス脳腫瘍モデルにおけるタンパク質の発現を測定した。悪性度の低い H4 細胞において特定のタンパク質を過剰に発現させ、放射線照射後の生存率を解析することにより当該タンパク質の放射線抵抗性への関与を調べた。パラクライン効果を検討するために、H4 細胞に U87MG 細胞の馴化培地を添加し、EGFR のリン酸化レベルを測定した。さらに、二次元および三次元共培養試験を行い、U87MG の分泌物が隣接する細胞の増殖に与える効果を調

べた。【結果と考察】X線照射後のU87MG細胞において、RabファミリーのうちRAB27Bが最も増加しており、Rab27bタンパク質の発現亢進は少なくとも7日間以上持続した。興味深いことに、Rab27bのアイソフォームであるRab27aはX線照射により増加していなかった。Rab27bの発現亢進は膠芽腫の予後と相関することが報告されているが、放射線を照射された細胞におけるRab27bの役割は解明されていない。そのため、膠芽腫細胞の放射線への応答におけるRab27bの役割に着目し、解析を進めた。shRNAによりRab27bを抑制した細胞では、放射線照射後のアポトーシスが増加し、細胞生存率が減少した。マウス脳腫瘍モデルにおいて、Rab27bの抑制はX線照射後における脳腫瘍の成長を抑制し、担がんマウスの生存期間を延長した。これらの結果から、Rab27bが膠芽腫の放射線抵抗性に貢献することが示された。放射線照射後のU87MG細胞におけるマイクロアレイデータおよびTCGA解析から、Epidermal growth factorの一種であるEpiregulin (EREG)がX線照射後に亢進し、Rab27bの発現と相関していることがそれぞれ分かった。さらに、悪性度の異なる5つの神経膠腫細胞株において、Rab27bの発現はEREGと相関している傾向が見られた。興味深いことに、Rab27bの発現を抑制するとEREGの発現も減少し、逆にEREGの発現を抑制するとRab27bの発現も減少した。また、Rab27bを過剰発現させるとEREGの発現も上昇し、逆にEREGの発現を過剰発現させるとRab27bの発現が上昇した。これらの結果は、Rab27bとEREGの間にポジティブフィードバックループが存在することを示唆する。Rab27bと同様に、EREGの発現はX線照射後の膠芽腫細胞において上昇し、少なくとも7日間持続した。EREGの発現を抑制すると、放射線照射後の細胞生存率が減少した。Rab27bおよびEREGの発現が低いH4細胞と、両者の発現が高いU87MG細胞の放射線抵抗性を比較したところ、U87MG細胞の放射線抵抗性がより高かった。さらに、H4細胞にRab27bまたはEREGを過剰発現させると、H4細胞の放射線抵抗性が増加した。マウス脳腫瘍においても、X線照射後にRab27bおよびEREGの発現が亢進していた。しかし、Rab27bの発現を抑制した腫瘍においては、X線照射後におけるEREGの上昇が抑制された。これらの結果から、Rab27bとEREGの共亢進が膠芽腫の放射線抵抗性に貢献していることが示された。次に、パラクラインアッセイを行ったところ、U87MG細胞の馴化培地はH4細胞のEGFRのリン酸化を亢進した。この効果はU87MG細胞におけるX線照射により増強したが、Rab27bおよびEREGを抑制すると減弱した。H4細胞とU87MG細胞を二次元および三次元で共培養することにより、H4細胞の増殖が亢進した。このような増殖亢進効果は、U87MG細胞におけるX線照射によりさらに亢進し、Rab27bの抑制により減弱した。これらの結果から、膠芽腫細胞のパラクライン効果にはRab27bおよびEREGのX線照射後の共亢進が寄与していることが示された。以上の知見は、Rab27b-EREG経路を阻害することで、膠芽腫細胞の放射線抵抗性および近傍細胞へのパラクライン効果を抑制し、治療効果を向上する可能性を示唆する。Rab27b-EREG間のポジティブフィードバックループの詳細なメカニズムや、Rab27bが制御するその他の分泌因子などは解明に至っていない。膠芽腫の放射線抵抗性メカニズムの全容を解明するためには、さらなる研究が必要である。【結論】Rab27bの発現亢進は、膠芽腫の放射線抵抗性を促進し、EREGの発現や近傍細胞へのパラクライン効果を促す役割を持つことが示された。本研究で得られた知見は、Rab27b-EREG経路が膠芽腫の放射線療法の効果を向上するための新たな標的となる可能性を提示する。