



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15037
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86138
Type	doctoral thesis
File Information	Soichiro_Nishioka.pdf



学 位 論 文

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)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

西岡 蒼一郎

目 次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
緒言	3
略語表	7
実験方法.....	9
実験結果.....	25
考察	54
総括および結論	59
謝辞.....	61
引用文献.....	61

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部を以下の論文に発表した。

Nishioka, Soichiro, Ping-Hsiu Wu, Toshiaki Yakabe, Amato J. Giaccia, Quynh-Thu Le, Hidefumi Aoyama, Shinichi Shimizu, Hiroki Shirato, Yasuhito Onodera, and Jin-Min Nam.

Rab27b contributes to radioresistance and exerts a paracrine effect via epiregulin in glioblastoma

Neuro-Oncology Advances, 2(1): vdaa091, 2020

本研究の一部を以下の学会に発表した。

1. 西岡蒼一郎, 呉秉修, 謝綺哲, 小野寺康仁, 清水伸一, 白土博樹, 南璣旻
グリオブラストーマ細胞における Rab27 の放射線抵抗性への関与
第3回北大・部局横断シンポジウム, 2018年1月, 北海道大学
2. 西岡蒼一郎, 呉秉修, 謝綺哲, 小野寺康仁, 清水伸一, 白土博樹, 南璣旻
膠芽腫細胞における Rab27 の放射線抵抗性への関与の調査
第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月, パシフィコ横浜
3. Soichiro Nishioka, Ping-Hsiu Wu, Yasuhito Onodera, Amato J. Giaccia, Quynh-Thu Le, Shinichi Shimizu, Hiroki Shirato, Jin-Min Nam
Involvement of Rab27 in radiosensitivity of glioblastoma cells
ASCB / EMBO 2018 Meeting, 2018年12月, San Diego Convention Center
4. 西岡蒼一郎, 呉秉修, 小野寺康仁, 清水伸一, 白土博樹, 南璣旻
グリオブラストーマの放射線治療抵抗性における Rab27b の関与
第42回日本分子生物学会年会, 2019年12月, マリンメッセ福岡

5. 西岡蒼一郎, 吳秉修, 矢ヶ部俊彰, Amato J. Giaccia, Quynh-Thu Le, 青山英史, 清水伸一, 白土博樹, 小野寺康仁, 南璣旼
Rab27b は神経膠芽腫の放射線抵抗性やパラクライン効果を促進する
日本放射線腫瘍学会第 33 回学術大会, 2020 年 10 月, web 開催

6. 西岡蒼一郎, 吳秉修, 矢ヶ部俊彰, Amato J. Giaccia, Quynh-Thu Le, 青山英史, 清水伸一, 白土博樹, 小野寺康仁, 南璣旼
Rab27b は Epiregulin を介して神経膠芽腫の放射線抵抗性やパラクライン効果を促進する
第 6 回 北大・部局横断シンポジウム, 2020 年 10 月, 北海道大学医学部学友会館フラテホール (web 開催)

7. 西岡蒼一郎, 吳秉修, 矢ヶ部俊彰, Amato J. Giaccia, Quynh-Thu Le, 青山英史, 清水伸一, 白土博樹, 小野寺康仁, 南璣旼
Rab27b は神経膠芽腫の放射線抵抗性や、Epiregulin を介したパラクライン効果を促進する
日本放射線影響学会第 64 回大会, 2021 年 9 月, ザ・ヒロサワ・シティ会館 (WEB 開催)

緒 言

膠芽腫は、最も高頻度な原発性悪性脳腫瘍であり、中枢神経系の原発性悪性腫瘍全体の約 48%、神経膠腫全体の約 57%を占めている (Ostrom et al., 2018)。膠芽腫の標準的な治療法は、手術後にテモゾロミドを併用した放射線治療を行い、さらにテモゾロミドを補助的に投与することである (Tan et al., 2020)。膠芽腫の治療法は少しずつ進歩しているものの、5 年生存率は依然として 10%未満である (Ostrom et al., 2018)。近年の前臨床研究においても、膠芽腫における放射線治療の効果を高めるために利用可能な分子経路が特定されているが、臨床的に有効な薬剤を得ることができなかった (Bindra et al., 2017; Chang et al., 2007)。治療効果を向上させるための標的を探るために、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と考えられる。

放射線治療は、膠芽腫の治療において、局所制御と生存率の両方を改善するために長年使用されており、現在でも重要な治療法である (Tan et al., 2020)。しかし、多くの場合において、生存した細胞が増殖して再発が生じるため、依然として予後が悪い (Chen et al., 2015; Gupta et al., 2012)。放射線に対する抵抗性を生む原因の一つとして考えられているのが、小胞やタンパク質などの分泌因子を介した細胞間コミュニケーションである (Kang et al., 2016; Ni et al., 2019; Yue et al., 2019)。腫瘍微小環境における放射線誘発性の分泌因子を介した細胞間コミュニケーションは、がん細胞の生存や増殖、浸潤を促進することで放射線抵抗性や腫瘍進行を促進することが乳がんや神経芽腫などにおいて示されているが (Aravindan et al., 2014; Vilalta et al., 2014)、膠芽腫の放射線治療後の分泌因子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 ファミリータンパク質は、様々な種類の細胞内膜輸送を制御する Ras 様低分子量 GTPase であり、すべての真核生物に存在する (Hutagalung and Novick, 2011; Stenmark, 2009)。一般に Rab は、Guanosine triphosphate (GTP) が結合した活性状態と Guanosine diphosphate が結合した不活性状態の 2 つのヌクレオチド結合状態を循環させることで分子スイッチとして機能し、活性化された Rab は、ドナー膜からの小胞の出芽、小胞の輸送、輸送小胞とアクセプター膜とのドッキング・融合など、膜輸送の様々なステップを制御する (Barr and Lambright, 2010; Segev, 2001)。Rab をコードする遺伝子の変異や、Rab タンパク質の発現異常は、

細胞内小胞輸送ネットワークを破壊し、腫瘍形成能、細胞移動、転移挙動を変化させる。いくつかの Rab 遺伝子は、様々ながんにおいて発がん性ドライバーとして働くことにより、腫瘍の成長や進展に対して促進的な役割を果たす。一般に、Rab 遺伝子の変異よりも増幅の方が、腫瘍形成やがんの進行と関連している。(Gopal Krishnan et al., 2020; Thomas et al., 2014; Wheeler et al., 2015; Yang et al., 2015)。

Rab ファミリーは、哺乳類で最大の膜輸送タンパク質ファミリーであり、ヒトには 70 以上の Rab アイソフォームが存在する (Diekmann et al., 2011; Pereira-Leal and Seabra, 2000)。Rab27 は Rab ファミリーの一つであり、後生動物に広く保存されている。脊椎動物では、Rab27 は 2 つのアイソフォーム、すなわち Rab27a と Rab27b から構成されている。Rab27a と Rab27b はいずれも、小胞の細胞外への輸送やタンパク質の分泌を制御し、細胞間コミュニケーションに関与することが知られている (Bobrie et al., 2012; Feng et al., 2016; Fukuda, 2013; Wang et al., 2015, 2008; Wu et al., 2013)。小胞には脂質、核酸、タンパク質など多様な生理活性物質が含まれており、細胞間で小胞が輸送されることで情報が伝達される (Henderson and Azorsa, 2012; Tian et al., 2010)。Rab27a は、メラノサイト、細胞障害性 T リンパ球、および外分泌細胞、内分泌細胞、卵巣細胞、造血細胞を含む様々な分泌細胞に広く発現している (Gomi et al., 2007; Tolmachova et al., 2004)。Rab27a の機能不全は、ヒトの遺伝性疾患である 2 型グリセリ症候群の原因となることが報告されており (Van Gele et al., 2009)、慢性炎症との関連も指摘されている (Alexander et al., 2017)。Rab27b は、主に血小板、胃、大腸、膵臓、下垂体、膀胱などに発現している (Chen et al., 2004, 2003; Zhao et al., 2002)。現在までに、疾患の原因となる Rab27b の変異は同定されていない。Rab27b は Rab27a とともに様々な分泌細胞に発現していることが多く (Gomi et al., 2007)、Rab27b は Rab27a のエフェクターすべてに結合する能力を持っていることが分かっている (Fukuda, 2008)。また、Rab27a と Rab27b のアミノ酸配列の相同性は 71% と高く、両者は共通の Rab27 エフェクターを共有するため、分泌経路において同様に機能していると考えられていた (Barral et al., 2002)。実際に、Rab27a と Rab27b が同様の機能を示す例が報告されている (Kariya et al., 2011)。しかしながら、Rab27a と Rab27b が同じ細胞株においてもタンパク質や小胞輸送において異なる役割を果たす例が報告されており (Johnson et al., 2010; Ostrowski et al., 2010; Singh et al., 2013)、Rab27a と Rab27b の機能の類似性は細胞種に依存すると考えられる。神経膠細胞や膠芽腫細胞における Rab27a と Rab27b の機能の類似性に関する報告はない。

Rab27は細胞や組織の生理的機能を適切に維持するために重要であり、Rab27の発現異常は様々なヒトのがんで観察され、がんの進行や悪性に寄与している。Rab27a および／または Rab27b は、Matrix metalloproteinases (MMPs) や Cathepsin D、Cytokines、Growth factors などのタンパク質の放出を調節することで、腫瘍の進行および転移を促進することが示されている(Bobrie et al., 2012; Dornier et al., 2017; Feng et al., 2016; Li et al., 2017; Wang et al., 2015, 2008; Wu et al., 2013)。神経膠腫細胞において、Rab27a は細胞の増殖能を高め、アポトーシスを減少させることが示された(Wu et al., 2013)。Wang らは、低悪性度グリオーマと比較して、高悪性度グリオーマ(膠芽腫)では Rab27b のプロモーター領域における Deoxyribonucleic acid (DNA) メチル化が低下しており、Rab27b のタンパク質発現量が多いことを示した。さらに、膠芽腫において Rab27b の低メチル化または過剰発現が見られる患者の生存予後が不良であることを報告した(Wang et al., 2015)。X線照射後の MCF-7 乳がん細胞では、RAB27B messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現が増加していることが示されているものの、X線照射後のタンパク質レベルの解析や、Rab27b の発現を抑制することによる効果の検証は行われていない(Jabbari et al., 2019)。このように、Rab27a および Rab27b の発現異常は神経膠腫細胞においても確認されているが、放射線抵抗性における Rab27 の役割は明らかにされていない。

がん細胞から放出される分泌因子は、がん細胞の増殖、生存、浸潤、腫瘍微小環境のリモデリングなどを促進する重要な役割を担っている(Almiron Bonnin et al., 2018; Fidoamore et al., 2016)。いくつかの分泌因子は、細胞の生存や増殖のシグナルを活性化し、近傍の細胞に変化を誘導する、すなわちパラクライン効果を発揮することがわかっている。パラクライン効果を誘導する分泌因子としては、Kit ligand (Sun et al., 2006)、stromal cell-derived factor-1 (Maksym et al., 2009)、Vascular endothelial growth factor (VEGF) (Kil et al., 2012)、Interleukin (IL) - 8 (Brat et al., 2005)、Eprex (EREG) (Takahashi et al., 2003; Wilson et al., 2012)などが報告されている。EREGは上皮成長因子(Epidermal growth factor; EGF)ファミリーの一員であり、EGF受容体(EGF receptor; EGFR)のリガンドである。EREGは、翻訳直後は膜貫通型の Proepiregulin として細胞膜上に局在し、その後、C末端プロペプチドと成熟型の EREG に加工される。成熟した EREG は細胞外に放出され、EGFR に結合して EGFR の活性化を引き起こし、細胞の増殖を促す(Baba et al., 2000; Takahashi et al., 2003)。他の成長因子である VEGF や Fibroblast growth factor などは放射線抵抗性に関与していることが知られているが(Chen et al., 2020; Green et al., 2007; Harpain et al., 2019)、EREG の放射線治療との関連は報告されていない。

本研究では、膠芽腫において放射線照射後に **Rab27b** の発現が有意に上昇し、*in vitro* および *in vivo* の両方で放射線抵抗性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、放射線照射後に亢進した **Rab27b** は EREG の発現を正に制御し、周辺の細胞において EGF 受容体 (EGFR) を活性化するパラクラインシグナルに関与していることを示した。本研究の結果は、**Rab27b-EREG** 経路を阻害することで、膠芽腫の放射線治療の効果を向上させる可能性を提示するものである。

略 語 表

2D	Two dimensional
3D	Three dimensional
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ATCC	American Type Culture Collection
DAB	3,3' - Diaminobenzidine
DAPI	4',6 - diamidino - 2 - phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EREG	Epiregulin
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GTP	Guanosine triphosphate
HyPBase	Hyperactive piggyBac transposase
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukin
IR	Ionizing radiation
IVIS	<i>In vivo</i> imaging system
MMP	Matrix metalloproteinase
NF-kB	Nuclear factor kappa B
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
RNA	Ribonucleic acid
RT	Room temperature
Red-Fluc	Redshifted <i>Luciola italica</i> luciferase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20
TCGA	The Cancer Genome Atlas

VEGF	Vascular endothelial growth factor
cDNA	Complementary DNA
lrECM	Laminin rich extracellular matrix
mRNA	Messenger RNA
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA

実験方法

1. 細胞培養

ヒトグリオーマ細胞株 H4、SW1088、A172、U118MG、U87MG は、American Type Culture Collection (ATCC) から購入し、ATCC のプロトコールに従って培養した。H4、A172、U118MG 細胞を、10%の牛胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich) により、湿式インキュベーターを用いて 37°C、5% CO₂ で培養した。SW1088 細胞は、10% FBS を添加した L-15 培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、大気中 37°C で培養した。U87MG 細胞は、10%の FBS を添加した Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich) を用いて、5% CO₂ 中、37°C で培養した。

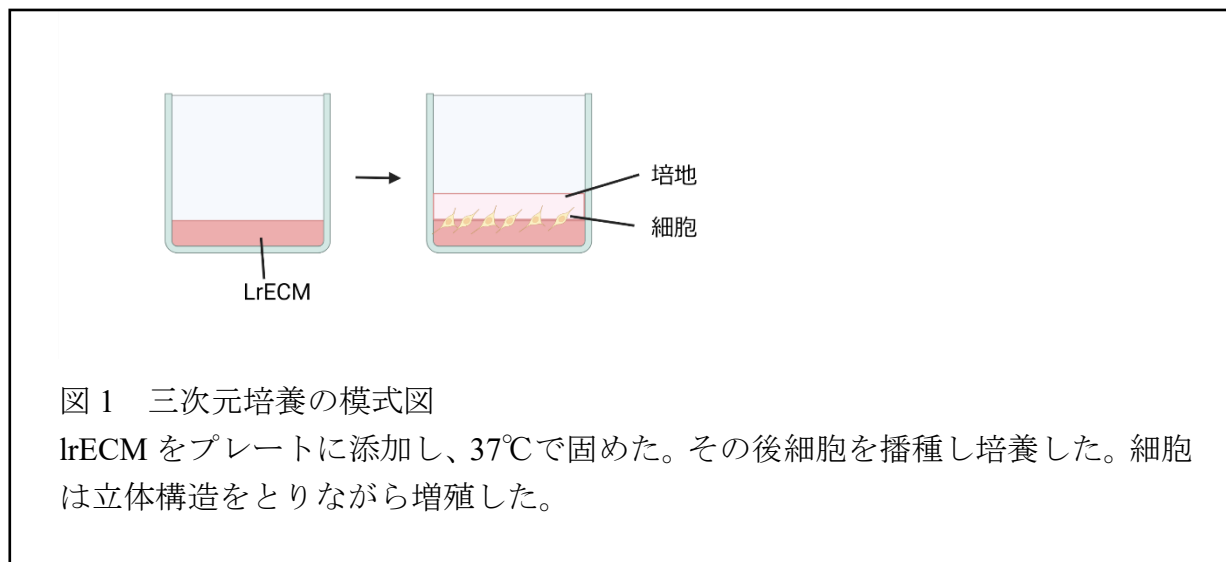
2. 細胞の継代

細胞密度が 70~80%に達した時に細胞の継代を行った。培地を捨て、Phosphate buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄) で Wash した後、0.05% Trypsin-Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (0.5 g/L-Trypsin/0.53 mmol/L-EDTA Solution; Nacalai tesque) または 0.25% Trypsin-EDTA (2.5 g/L-Trypsin/0.53 mmol/L-EDTA Solution; Nacalai tesque) を加えて細胞をはがした。10% FBS を含有した培地を加えて Trypsin の働きを止め、はがれた細胞を回収し、遠心 [110 × g, Room temperature (RT) , 3 min] した。上清を 2 mm ほど残して捨て、培地で懸濁した。ビルケルチュルク血球計算器により細胞の濃度を計算して適宜に細胞を播種し、37°C、5% CO₂ で培養した。

3. 三次元ラミニンリッチ細胞外マトリックス培養

細胞をより生体内に近い三次元的な状態で培養するために、三次元ラミニンリッチ細胞外マトリックス (three-dimensional laminin-rich extracellular matrix ; 3D lrECM) 培養を行った。ラミニンリッチ細胞外マトリックスとして、Growth factor-reduced Basement Membrane Matrix (Corning) を使用し、過去に記載された方法で細胞を培養した (Lee et al., 2007)。6 well plate または 12 well plate に lrECM をコートし、37°C で 30 min インキュベートした後、細胞を lrECM 上に播種し、37°C

で1 h インキュベートして細胞を接着させた。細胞接着後、培地を Culture medium supplemented with 5% lrECM に置き換え、37°C、5% CO₂ で培養した (図 1)。4 日間以上培養する場合は、3 日毎に培地を交換した。



4. X 線照射

In vitro 実験では、CellRad 社の X 線発生装置 (Precision) を用いて 130 kV で X 線を細胞に照射した。*In vivo* 試験では、腫瘍を移植したマウスの全脳に 150 kV で X 線を照射した (HITACHI)。実験に応じて、2、4、6、8 Gy の線量を照射した。

5. マイクロアレイ解析

3D lrECM で培養した U87MG 細胞に、4 Gy の放射線を 24 h おきに 4 回照射した。U87MG 細胞から NucleoSpin RNA キット (MachereyNagel) を用いて Total RNA を抽出した。高感度 3D-Gene Human Oligo chip 25k version 2.10 を用いたマイクロアレイ解析を東レに委託した。データは無処理群の対応するデータにより正規化した。

6. RNA の単離

細胞から Total RNA を抽出するために、TRI Reagent (Sigma-Aldrich) を用いた。1 mL の TRI Reagent により細胞を溶解し、室温で 5 min 静置した。200 μ L のクロロホルムを加え、15 sec ボルテックスした。遠心 (13,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 15 min) し、水層を新しいチューブに移した。500 μ L のイソプロパノールを加え、混合し、室温で 5 min 静置し、遠心 (13,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) した。上清を除去し、1 mL の 75% エタノールを加え、遠心 (4 $^{\circ}$ C, 13,000 \times g, 5 min) した後、上清を除去して風乾し、20 μ L の DEPC-treated H₂O でペレットを溶解した。次に、抽出された RNA に対して RQ1 DNase (Promega) により DNase 処理を行った。20 μ L の RNA 溶液、15 μ L の 10 \times RQ1 DNase Buffer、3 μ L の RNase inhibitor、4.5 μ L の RQ1 DNase、107.5 μ L の milli-Q water を混合し、37 $^{\circ}$ C で 15 min インキュベートした。150 μ L の Phenol/Chloroform/IAA (Nippon Gene) を加え、ボルテックスした後、遠心 (13,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 1 min) し、上清を 1.5 mL チューブに移した。15 μ L の 3M NaOAc と 375 μ L の氷冷した 100% エタノールを加えた。-20 $^{\circ}$ C で一晩静置した後、遠心 (13,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 30 min) した。上清を捨て、1 mL の 75% エタノールを加え、遠心 (13,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 1 min) し、上清を捨てた。この操作をもう一度繰り返した。ペレットを風乾し、20 μ L の DEPC 処理水 (Thermo Fisher Scientific) で RNA を溶解した。Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific) で RNA 濃度を測定した。

7. Complementary DNA (cDNA) 合成

cDNA を合成するために SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) を使用した。1 μ L の 50 μ M Oligo d(T)₂₀ primer、1 μ L の 10mM dNTP mix、2 μ g の Total RNA、DEPC 処理水を混合して合計 13 μ L とした。65 $^{\circ}$ C で 5 min インキュベートし、1 min 氷上に静置した。4 μ L の 5 \times SSIV buffer、1 μ L の 100 mM DTT、1 μ L の RNase inhibitor、1 μ L の SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) を加え、55 $^{\circ}$ C で 10 min インキュベートした後、80 $^{\circ}$ C で 10 min インキュベートして反応を停止させた。

8. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

Real-time PCR を行うために、FastStart Essential DNA Green Master kit (Hoffman-La Roche Ltd) を使用し、Light Cycler 96 (Hoffman-La Roche Ltd) により解析した。10 μ L の FastStart Essential DNA Green Master、5 μ L milli-Q water、1 μ L の Forward primer、1 μ L の Reverse primer、1 μ L cDNA を混合し、Real-time PCR に供試した。反応条件は以下の通りである。Preincubation (95°C for 600 s)、3 step amplification (95°C for 10 s, 60°C for 10 s, 72°C for 10s, 50 cycles) , melting (95°C for 10 s, 65°C for 60 s, 97°C continuous)。プライマーの配列を表 1 に記載した。

表 1 Real time PCR に用いたプライマーの配列

Primers (5'-3')		
18S rRNA	Foward	TCGGAAGCTGAGGCCATGATT
	Reverse	CCTCCGACTTTCGTTCCTTGATT
Rab27b	Foward	TAGACTTTCGGGAAAAACGTGTG
	Reverse	AGAAGCTCTGTTGACTGGTGA

9. 過剰発現

目的遺伝子を過剰発現させるために、cDNA を piggyBac トランスポゾンベースのベクターpPB CEH MCS IP にサブクローニングした。まず、U87MG における Total RNA を抽出して cDNA を合成した。次に、PCR により目的遺伝子の DNA 配列を増幅させ、pcDNA3.1 HisC にライゲーションした。次に、制限酵素により Xpress タグとともに目的遺伝子の配列を切り出し、ベクターpPB CEH MCS IP にライゲーションした。得られたベクターを Hyperactive piggyBac transposase (HyPBBase) を発現するベクターを同時に細胞にトランスフェクションし、セレクトクシオンすることで過剰発現細胞株を作成した。すべての遺伝子組換え実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に従って実施された。

10. タンパク質の抽出

A. Cell Scraper を用いる方法

二次元培養した細胞の溶解液を得るために、Cell scraper (Corning) を用いて細胞を溶解した。培養皿上の細胞を氷冷した 1×PBS で洗浄した後、氷上で細胞に 1% Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) , 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) , 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1× protease inhibitor cocktail (Merck Millipore)] を加え、Cell Scraper を使用して細胞を培養皿からはがした。回収した溶液を 5 min 毎に 15 sec ボルテックスして攪拌し、遠心 (15,000 rpm, 4°C, 15 min) した。上清を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、細胞溶解液とした。

B. 三次元細培養した細胞の溶解

氷上で 0.5 M EDTA in PBS を加え、ハサミで先端を切った 1,000 μ L 用のチップでマトリゲルをかき混ぜ、15 mL チューブに回収した。氷上でゆらしながら 30 min おいた後、遠心 (1,000 \times g, 4°C, 5 min) した。上清を捨てて 1% RIPA で沈殿を懸濁し、5 min 毎に 15 sec ボルテックスし、超音波破碎 (high, 10 sec on, 30 sec off, 7 cycle; Bioruptor, Cosmo bio) した。遠心 (15,000 rpm, 4°C, 15 min) 後、上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、細胞溶解液とした。

11. タンパク質濃度の定量

細胞溶解液中のタンパク質濃度を測定するために、DC Protein Assay を行った。DC Protein Assay は、試料中のタンパク質濃度を測定するための標準的な方法である。すべての手順は室温で行われた。DC Protein Assay Reagent は Bio-Rad より購入した。

DC Protein assay Reagent A と DC Protein assay Reagent S を 50:1 の割合で混合し A' とした。1.5 mL チューブに 2.5 μ L の 1% RIPA buffer と 2.5 μ L の細胞溶解液を加えた。25 μ L の A'、200 μ L の DC Protein assay Reagent B を加えてボルテックスし、室温で 15 min 静置した。96 well plate に 100 μ L ずつ移し、マイクロプレートリーダー (Multiskan Go; Thermo Fisher Scientific) で 750 nm の波長を測定した。事前に作成した検量線からサンプルのタンパク質濃度を算出した。

12. ウェスタンブロッティング

タンパク質の発現を解析するために、ウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングは、電気泳動によって分離したタンパク質を膜（メンブレン）に転写し、任意のタンパク質に対する抗体でそのタンパク質を検出する手法である。

まず SDS – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) または Nu-PAGE を行い、分子量に応じてタンパク質を分離した。SDS-PAGE はタンパク質解析に用いられる標準的な電気泳動法である。Nu-PAGE はよりタンパク質分解能が高い電気泳動法である。

SDS-PAGE のために、タンパク質 10~20 μg の細胞溶解液を milli-Q water、4× Sample buffer [4 mL の Glycerol, 2.5 mL の 1M Tris-HCL (pH6.8) , 2 mL の 2-Mercaptoethanol, 0.8 g の SDS, 4 mg の Bromophenol Blue, 1.5 mL の milli-Q water] と混合し 20 μL の Loding Sample とした。これを熱した (100°C, 5 min) 後、SDS Running buffer (25mM Tris-HCl, 250 mM Glycine, 2.7 mM SDS) に浸したアクリルアミドゲルに Load し、電気泳動 (25 mA, 90 min) した。電気泳動装置には Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad) を使用した。

Nu-PAGE のために、タンパク質 10~20 μg の細胞溶解液を milli-Q water、Nu-PAGE Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) と混合し 20 μL の Loding Sample とした。これを熱した (70°C, 10 min) 後、Nu-PAGE Running buffer (Thermo Fisher Scientific) に浸した Nu-PAGE Bis-Tris Gels (Thermo Fisher Scientific) に Load し、電気泳動 (110 V, 90 min) した。電気泳動装置には XCell SureLock Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

電気泳動後のゲルを取り出し、Transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 0.9 mM SDS, 20% Methanol) に浸した装置にセットして Polyvinylidene fluoride メンブレン (Merck Millipore) へと転写 (50 V, 120 min) した。転写後のメンブレンを Odyssey Blocking Buffer (LI-COR) に浸して室温で 1 h 振とうしてブロッキングした。ハイブリバッグ (Cosmo bio) に抗体を懸濁した Odyssey buffer をメンブレンとともに封入し、室温で 2 h 振とうまたは 4°C で一晩インキュベートした。ハイブリバッグからメンブレンを取り出し、Tris buffered saline-tween 20 (TBST; 10 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween) に浸し 10 min 振とうさせる Wash 操作を 3 回繰り返した。IRDye で標識した二次抗体を加えた Odyssey blocking buffer にメンブレンを浸し、室温で 1 h 振とうした。TBST で 10 min Wash を 2 回行い、PBS で 1 度 Wash した後、二次抗体の蛍光標識を Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences) により検出した。

画像処理ソフトウェア Image J を用いて、得られたタンパク質のバンドにおけ

る輝度を定量化した。

13. 抗体

ウエスタンブロッティングや免疫蛍光染色には以下の一次抗体を使用した。抗 Rab27a ポリクローナル抗体 (17817-1-AP, Proteintech)、抗 Rab27b ポリクローナル抗体 (13412-1-AP, Proteintech)、抗 β -actin モノクローナル抗体 (A5441, Sigma-Aldrich)、抗 Xpress モノクローナル抗体 (R910-25, Thermo Fisher Scientific)、抗 EREG モノクローナル抗体 (D4O51, Cell Signaling Technology)、Immunohistochemistry (IHC) 用の抗 EREG ポリクローナル抗体 (PA5-24727, Thermo Fisher Scientific)、抗 EGFR モノクローナル抗体 (D38B1, Cell Signaling Technology)、抗 p-EGFR モノクローナル抗体 (Tyr1068; D7A5, Cell Signaling Technology)。

14. 免疫蛍光染色

細胞を 4% Paraformaldehyde (PFA) で固定し、0.2% Triton X-100 in PBS で 10 min、室温で透過処理した後、5% BSA in PBS で 1 h、室温でブロッキングした。細胞を一次抗体で一晩、4°C でインキュベートした後、PBS で洗浄し、Alexa Fluor 標識二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) でインキュベートした。F-actin を、ファロイジン (Thermo Fisher Scientific) で染色した。その後、細胞を PBS で洗浄し、0.5 μ g/mL の 4',6 - diamidino - 2 - phenylindole (DAPI) で 5 min インキュベートして核を染色した。

3D IrECM 培養細胞の免疫蛍光染色は、過去に記載された方法で行われた (Lee et al., 2007)。3D IrECM で培養した細胞をスライドガラスにプレーティングし、4% PFA で固定し、100 mM Glycine in PBS で洗浄した。細胞を Blocking buffer [10% goat serum, 1% goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment (Thermo Fisher Scientific) in IF buffer (0.2% Triton X-100, 0.1% BSA, 0.05% Tween 20, 0.05% NaN₃ in PBS)] で加湿室にて室温で 1.5 h ブロッキングし、続いてファロイジンでインキュベートして F-actin を染色した。その後、細胞を PBS で洗浄し、DAPI で 5 min インキュベートし、核を染色した。PBS で 10 min 洗浄した後、マウントした。蛍光画像は、Leica True Confocal Scanning (TCS) SP8 顕微鏡システム (Leica Microsystems) を用いて取得した。

15. Short hairpin RNA (shRNA) 導入細胞の構築

shRNA とは、特定のタンパク質を抑制させるために広く用いられているヘアピン型の RNA 配列である (McIntyre and Fanning, 2006)。

U87MG 細胞への shRNA 組み込みには、PiggyBac Transposon Vector System というトランスポゾンによるゲノムへの組み込みを行うシステムを用いた (Onodera et al., 2018)。

shRNA の標的配列は Rab27b に関する先行研究において使用されている配列を参考にして作成された (Hendrix et al., 2010; Kariya et al., 2011)。本研究で使用された shRNA の標的配列を表 2 に示す。

表 2 shRNA の標的配列

shRNA (5'-3')	
shCTL	ATCTCGCTTGGGCGAGAGTAAG
shRab27b #1	CCAGTCAACAGAGCTTCTT
shRab27b #2	AAACGTGTGGTTTATAATGCA
shEREG #1	CCCAATATATTCTGACCGTTAA
shEREG #2	CCACCAACCTTTAAGCAAA

上記の標的配列を持つ shRNA 導入細胞を構築するために、5' 側および 3' 側を miR-30 前駆体のアームに挟まれた shRNA を、5' 側の mTagBFP2 cDNA 配列とともに piggyBac トランスポゾンベースのベクター-pPB CEH MCS IP にサブクローニングした。まず、オリゴ DNA を Thermo Fisher Scientific より購入した。オリゴ DNA をリン酸化し、sense 鎖 DNA と antisense 鎖 DNA をアニーリングした。アニーリング済みの DNA をプラスミドベクター-pEN_TTmiRC2 にライゲーションした。ライゲーションには Takara Ligation Kit (Takara) を用いた。ベクターをコンピテントセル DH5 α (Cosmo bio) にトランスフォーメーションして抗生物質ゲンタマイシンを塗った LB 寒天培地 (10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl, 13 g Agar in 1 L milli-Q water) で培養した。生じたコロニーをつまようじでつついて 2 mL のゲンタマイシン含有 LB 液体培地 [(10 g の Tryptone, 5 g の Yeast extract, 10 g の NaCl) in 1 L milli-Q water] につけ、37°Cにて 8~12 h 培養した。白濁した培養液からプラスミド DNA を抽出し、制限酵素によりプラスミド DNA を切断して 10%アガロースゲルにて電気泳動した。プラスミド DNA の抽出には QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を使用した。インサート DNA が妥当な塩基数になっているかを確認した後、遺伝子制御学研究所にシークセンス解析を外注し、インサート DNA の配列がデザインした配列と一致していることを確認し

た。

次に、miR30-shDNA を mTagBFP2 cDNA 配列とともにプラスミドベクターpPBCEH MCS IP にライゲーションして DH5 α にトランスフォーメーションした。生じたコロニーを 100 mL のアンピシリン含有 LB 液体培地で一晩、37°C で培養し、NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) を使用して培養液からプラスミド DNA を抽出した。

shRNA を細胞に恒常発現させるために、得られたベクターDNA を U87MG 細胞に ViaFect Transfection Reagent (Promega) を用いて HyPBase ベクターとともにトランスフェクションした。Puromycin を添加してベクターDNA が導入された細胞をセレクトした。セレクト後の細胞をウエスタンブロッティングに供試し、Rab27b の発現量が抑制されていることを確認した。

16. アポトーシスアッセイ

アポトーシスの解析には、Annexin V-Fluorescein isothiocyanate (FITC) Apoptosis Detection Kit (Abcam) を用いた。Trypsin-EDTA で細胞を回収し、暗所で 10 min、Annexin V-FITC と室温でインキュベートした。ネガティブコントロールとして、Annexin V -FITC 染色を行っていない細胞を用意した。FACSAria III フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて FITC の蛍光を解析した。各群の最終的な平均 FITC 強度は以下のように算出した。(Annexin V-FITC 染色群の平均 FITC 強度) - (陰性コントロール群の平均 FITC 強度)。

17. コロニーフォーメーションアッセイ

細胞を 6 ウェルプレートに播種し、24 h 後に X 線を照射した。X 線照射の 14 日後に、細胞を 4% PFA で 10 min、室温で固定した。PBS で洗浄した後、コロニーを 1% Crystal violet で染色した。形成されたコロニーの数をカウントし、以下の式を用いてコロニー形成効率、細胞生存率を算出し、コントロールとの比を求めた。(式) コロニー形成効率=(形成されたコロニー数/ 播種した細胞数) × 100、細胞生存率={放射線照射後に形成されたコロニー数/[(コロニー形成効率/100) × 播種した細胞数]} × 100。

18. 細胞生存率の測定

細胞播種後、1日目と2日目に8 Gy ずつ X 線照射を行った。72 h 後、Trypsin-EDTA で細胞を回収し、カウントした。細胞数を無処理群で正規化し、相対的な細胞生存率を算出した。

19. *In Vivo* 実験

In vivo イメージングのために、Redshifted *Luciola italica* ルシフェラーゼ (Red-Fluc) を安定的に発現する U87MG-Luc 細胞を作製した。U87MG 細胞を Red-Luc 発現レンチウイルスに感染させ、10 µg/mL の濃度で Blasticidin S (Thermo Fisher Scientific) を用いてセレクションした。

同所性腫瘍の樹立のために、過去に記述された方法でマウスの脳に腫瘍細胞を注入した (Kramp and Camphausen, 2012)。ホクドーから5週齢の雌の BALB/c-nu/nu ノードマウスを入手した。shCTL または shRab27b #1 でトランスフェクションした U87MG-Luc 細胞を懸濁した (5 µL の PBS に 5×10^5 細胞)。0.3 mL の 1 mg/mL Medetomidine (共立製薬)、0.8 mL の 5 mg/mL Midazolam (アステラス製薬)、1.0 mL の 5 mg/mL Butorphanol (Meiji Seika ファルマ)、7.9 mL の滅菌水を混合して三種混合麻酔薬とし、マウス一匹あたりに 50 µL を腹腔に注射して眠らせた。頭部の皮膚を1~2 cm 切り込み、ブレグマから右に2 mm、前に1 mm の位置に針で頭蓋骨に穴をあけた (図 2)。ハミルトンシリンジ (ハミルトン) を用いてノードマウスの脳内に細胞懸濁液を注入した。頭蓋骨の表面から3 mm の深さで、1 min に 2.5 µL の速度で腫瘍細胞を注入した (図 3)。U87MG-Luc shCTL または shRab27b の腫瘍を持つマウスをさらに2群 (1群 12-15 匹) に分け、偽照射した対照群と、腫瘍細胞を移植して7日目から10日目に4 Gy を4回、全脳に分割照射した群とした。各群のマウス数は、shCTL が9匹、shRab27b が6匹、shCTL Ionizing radiation (IR) が7匹、shRab27b IR が8匹であった。50 mg/kg の D-ルシフェリン (Wako) をマウス腹腔内に注射した後、腫瘍細胞由来の生物発光を *In vivo* imaging system (IVIS Spectrum CT; PerkinElmer) により測定した。歩行困難や体重の20%以上の減少などの衰弱の兆候が見られるまでマウスを観察した後、マウスをサクリファイスして PBS で灌流し、4% PFA で固定した。GraphPad Prism を用いて Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。すべての動物実験は、北海道大学の動物実験委員会による承認を受けて実施された。

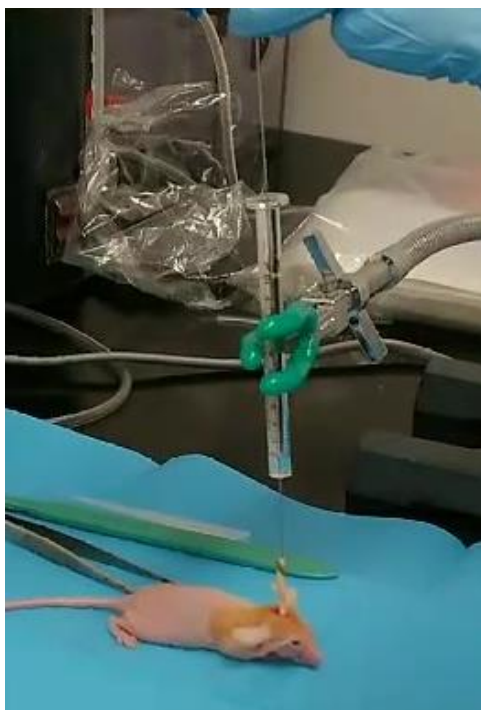
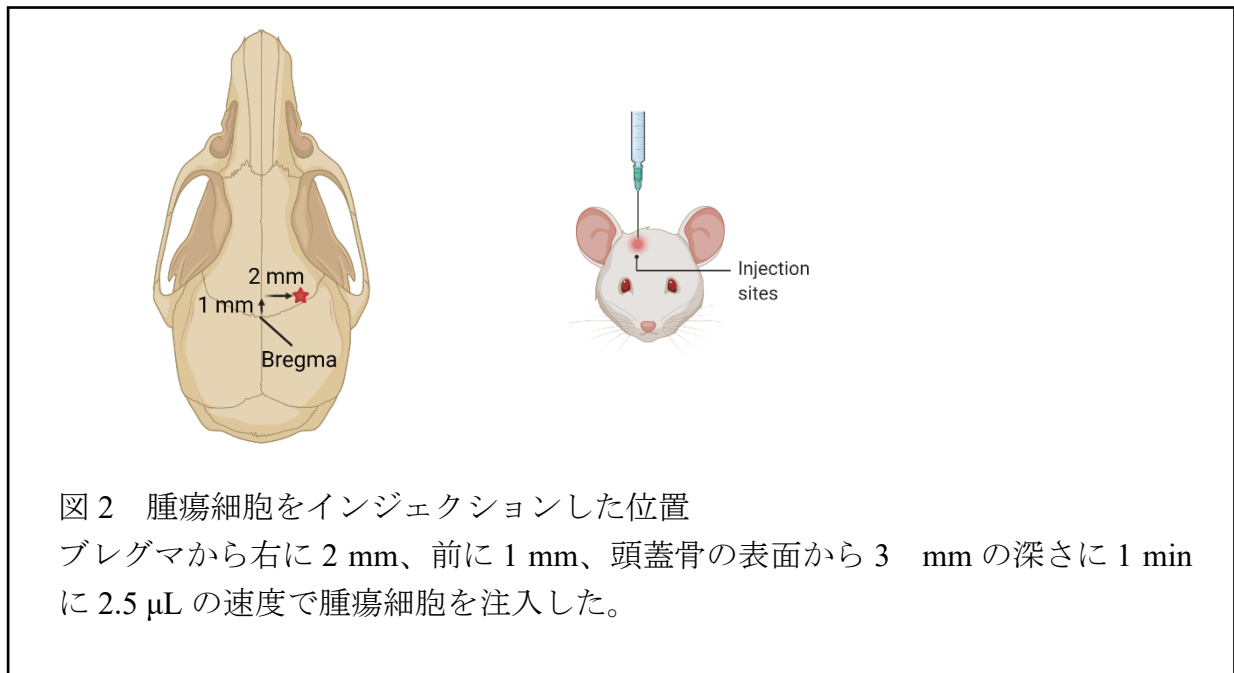


図3 マウスの脳に腫瘍細胞をインジェクションする様子

20. The Cancer Genome Atlas (TCGA) 解析

RNA-seq (n=160, RSEM) またはマイクロアレイ (n=206, Z-score) のデータを、膠芽腫患者の対応する臨床データとともに、TCGA から入手した。患者は、*RAB27A* または *RAB27B* の発現によって層別化され、上位 25%の患者は「*RAB27A/RAB27B-high*」、残りの患者は「*RAB27A/RAB27B-low*」のグループにそれぞれ分類された。また、*RAB27A-high* と *RAB27B-high* の両方の特徴を持つ患者 (*RAB27A/RAB27B-high/high*) を他の患者群と比較した。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、log-rank 検定で比較した。同じ分類を用いて、*EREG* の平均発現量との相関関係を調べた。分布や分散に依存しない Brunner-Munzel 検定を用いて統計的有意性を評価した。

21. Small interfering RNA (siRNA) とトランスフェクション

Lipofectamine RNAiMax 2.5 μ L と 50pmol siRNA を 1 mL の培養液あたり 100 μ L の Opti-MEM に入れて混合し、室温で 20 min インキュベートした。その後、この混合物を $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ の細胞に加えた。トランスフェクション後 72 h 後に各アッセイを行った。siRNA の配列は表 3 の通りである。

表 3 siRNA の配列

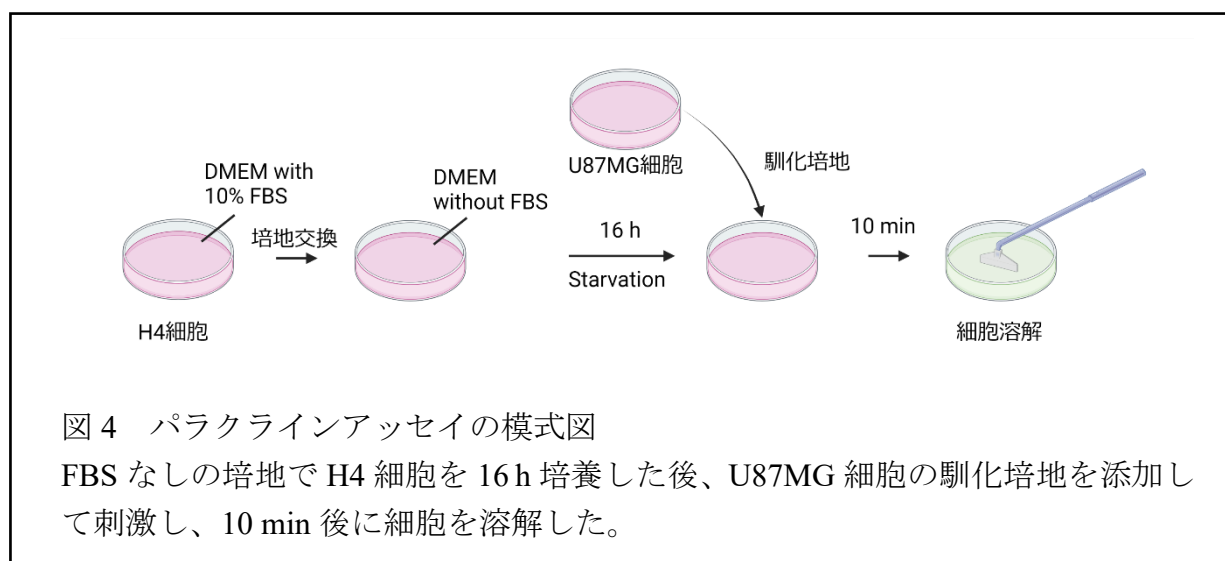
siRNA (5'-3')		
siCTL	Sense	CUCUCGCUUGGGCGAGAGUAAGdTdT
	Antisense	CUUACUCUCGCCCAAGCGAGAGdTdT
siRab27b #1	Sense	CCAGUCAACAGAGCUUCUdTdT
	Antisense	AAGAAGCUCUGUUGACUGGdTdT
siRab27b #2	Sense	UAGGAAUAGACUUUCGGGAAAdTdT
	Antisense	UUUCCCGAAAGUCUAUUCCUAdTdT
siEREG #1	Sense	CCCAAUAUAUUCUGACCGUUAAdTdT
	Antisense	UUAACGGUCAGAAUAUAUUGGGdTdT
siEREG #2	Sense	CCACCAACCUUAAGCAAAdTdT
	Antisense	UUUGCUUAAAGGUUGGUGdTdT

22. IHC

マウスを PBS および 4% PFA で灌流固定した後、解剖して脳を採取した。4% PFA に浸して 4°C で一晩固定し、エタノール勾配で脱水し、IHC 用のパラフィンブロックに包埋した。パラフィンブロックから 4 μ m の切片を顕微鏡スライドにマウントした。抗原賦活化のために、マウス脳切片のスライドを Antigen unmasking solution (Vector Laboratories) に浸し、95°C で 30 min インキュベートした。内因性ペルオキシダーゼを不活化するために、3% H₂O₂ で 10 min、室温でインキュベートした。スライドを 2% Blocking buffer (Roche) で 1 h インキュベートした後、一次抗体で 2 h インキュベートした。0.05% Tween 20 in PBS で 3 回洗浄した後、Super Sensitive IHC Detection Systems (BioGenex) でシグナルを増幅した。切片を Horseradish peroxidase 二次抗体で 30 min インキュベートした。2 回の洗浄後、ヘマトキシリン (武藤純正化学) でカウンター染色した。画像は Fiji (ImageJ) を用いて 3,3' - Diaminobenzidine (DAB) 画像にカラーデコンボリューションした後、Rab27b および EREG 染色の光学濃度 (Optical density; OD) を以下の式で定量した。OD = log (max intensity/mean intensity)、ここで max intensity は 8 ビット画像では 255 に等しい。相対 OD は以下のように計算した。(一次抗体が染色された DAB 画像の OD) - (陰性染色の DAB 画像の OD)。

23. パラクラリンアッセイ

細胞を飢餓状態にさせるために、H4 細胞の培地を FBS フリーの DMEM に交換した。16 h 培養した後、24 h 培養した U87MG 細胞の馴化培地を H4 細胞に加えた。10 min 後、H4 細胞を RIPA buffer で溶解し、ウェスタンブロッティングによりリン酸化 EGFR を測定した (図 4)。



24. 共培養試験

A. 二次元共培養試験

二次元共培養では、孔径 $0.4\ \mu\text{m}$ の細胞培養インサート (Millicell) に H4 または U87MG 細胞をプレーティングし、siRNA をトランスフェクションした。37°C で 24 h インキュベートした後、照射群には X 線を 8 Gy 照射した。6 ウェルプレートの下段に播種した H4 細胞に、細胞培養インサート (上段) を置いて共培養を開始した。3 日間培養した後、H4 細胞を回収し、カウントした (図 5)。H4 細胞との共培養をコントロールとし、測定された値をコントロールの細胞数で正規化した。

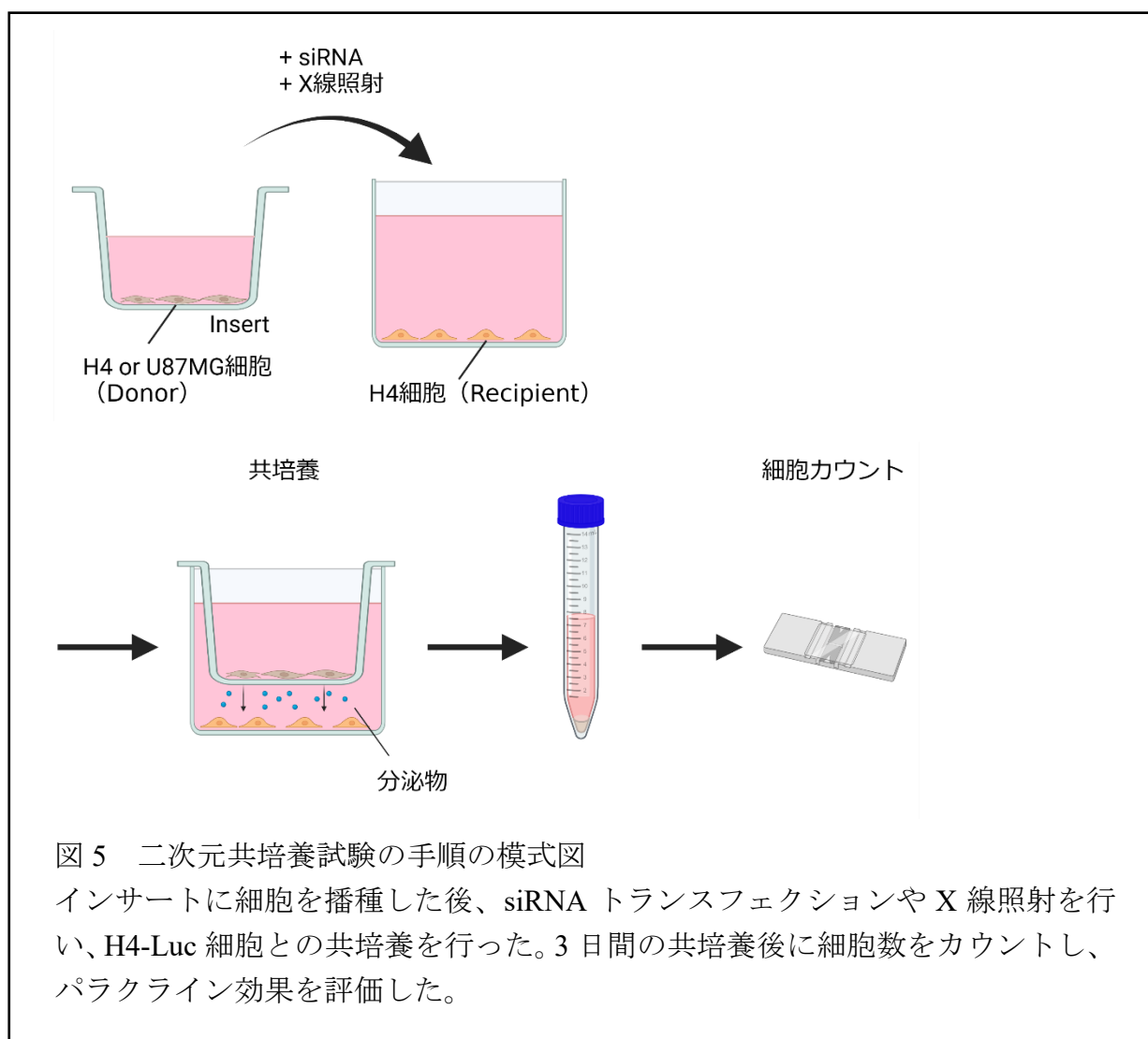


図 5 二次元共培養試験の手順の模式図

インサートに細胞を播種した後、siRNA トランスフェクションや X 線照射を行い、H4-Luc 細胞との共培養を行った。3 日間の共培養後に細胞数をカウントし、パラクライン効果を評価した。

B. 三次元共培養試験

三次元共培養では、24 ウェルプレートに H4 細胞または U87MG 細胞をプレーティングし、siRNA をトランスフェクションした。24 h 培養した後、X 線照射し、これらの細胞（下段）を 3D lrECM 上に播種し、さらに lrECM 層でサンドイッチコートした。次に、Red-Fluc をトランスフェクションした H4 細胞（H4-Luc）細胞（上段）を Matrigel 上に播種し、5% Matrigel を含む 100 μ L の培地を供給した。3 日間のインキュベーションの後、100 μ L の 10 mg/mL ルシフェリンを加えた。37°C で 1 h インキュベートした後、CLARIOstar（BMG Labtech）を用いて発光を測定した（図 6）。

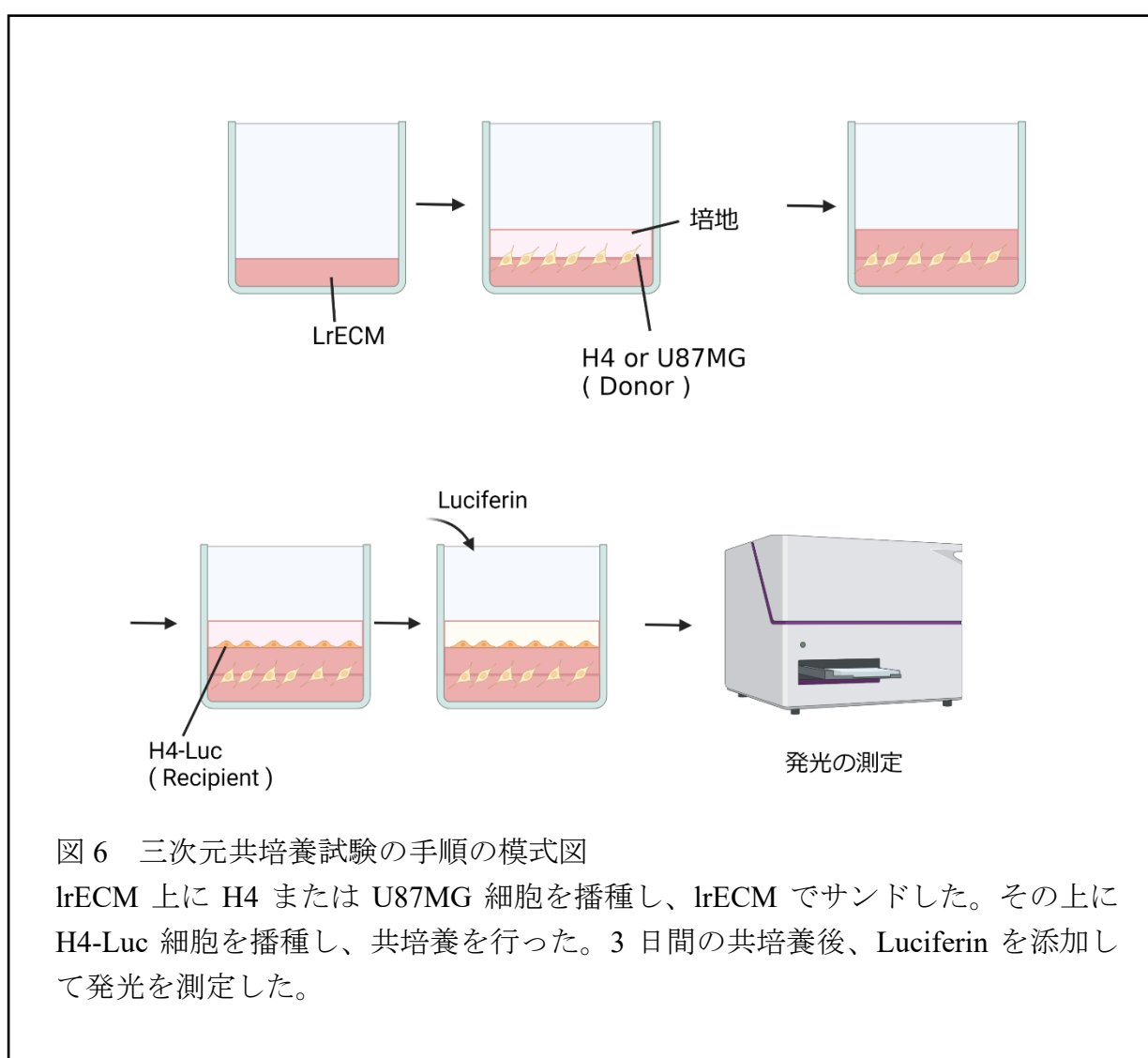


図 6 三次元共培養試験の手順の模式図

lrECM 上に H4 または U87MG 細胞を播種し、lrECM でサンドした。その上に H4-Luc 細胞を播種し、共培養を行った。3 日間の共培養後、Luciferin を添加して発光を測定した。

25. 統計解析

In vitro の実験は、少なくとも 3 回繰り返した。P 値の算出には、95%信頼区間付きの Unpaired 2-tailed t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満の場合は、統計的に有意な差があると判断した。すべての棒グラフおよびプロット図は平均値±標準誤差を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 1 \times 10^{-10}$, ns, not significant.

実験結果

1. 放射線照射後の膠芽腫細胞における Rab ファミリーの発現解析

1-1. 放射線照射後の U87MG 細胞では *RAB27B* の転写が亢進する

Rab GTPase は小胞輸送を制御する (Hutagalung and Novick, 2011; Pfeffer, 2017; Stenmark, 2009)。小胞やタンパク質の分泌は、腫瘍微小環境の再構築を介して治療抵抗性を誘導することが知られている (Al-Nedawi et al., 2009; Maacha et al., 2019; Mrowczynski et al., 2018)。どの Rab が膠芽腫において放射線照射後に役割を持つかを検討するために、放射線照射後の mRNA 発現を網羅的に解析した。三次元培養した U87MG 細胞に 4 Gy を 4 回照射し、DNA マイクロアレイ解析を用いて非照射 U87MG 細胞と照射細胞における Rab の mRNA 発現を比較した。Rab ファミリーのうち、*RAB27B* が最も上昇していた (図 7)。*Rab27b* は細胞外への小胞輸送やタンパク質の分泌を制御し、その発現亢進は膠芽腫を含め複数のがん種において予後不良に相関することが報告されている (Kariya et al., 2011; Ostrowski et al., 2010; Ren et al., 2016; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2016)。そこで、放射線照射後の膠芽腫細胞における *Rab27b* の役割を検討することとした。

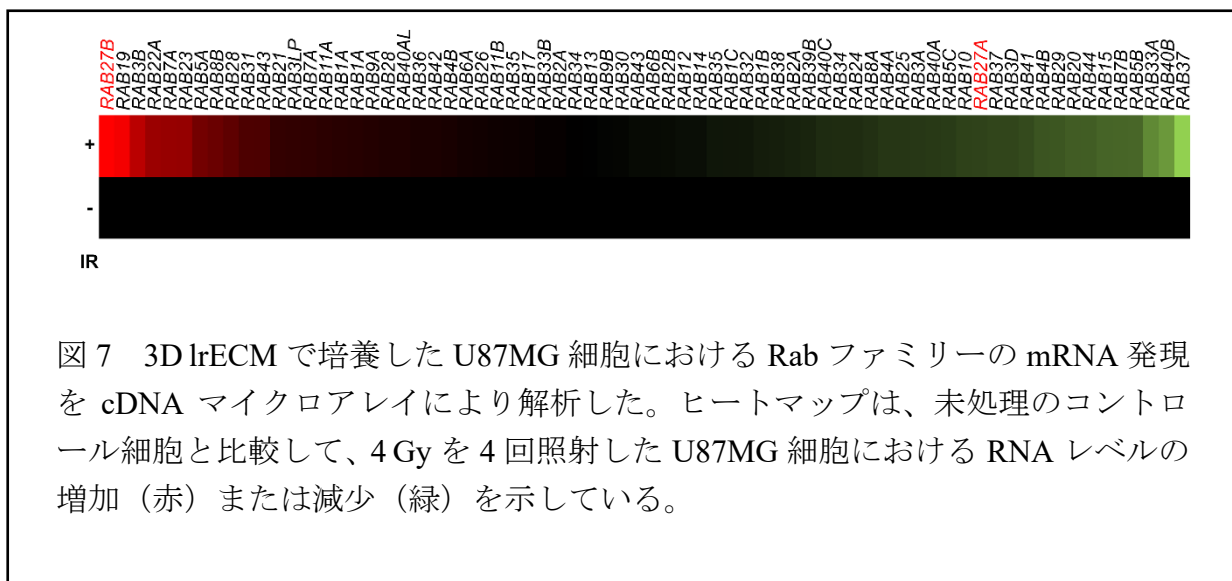


図 7 3D IrECM で培養した U87MG 細胞における Rab ファミリーの mRNA 発現を cDNA マイクロアレイにより解析した。ヒートマップは、未処理のコントロール細胞と比較して、4 Gy を 4 回照射した U87MG 細胞における RNA レベルの増加 (赤) または減少 (緑) を示している。

1-2. 放射線照射により Rab27b のタンパク質発現が亢進する

Rab27b の上昇をより確認するために、Real-time PCR による mRNA 解析を行った。Real-time PCR においても、放射線照射による *RAB27B* の上昇が確認された (図 8)。

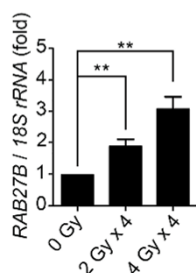


図 8 3D lrECM で培養した U87MG 細胞において、放射線照射後の *RAB27B* mRNA レベルを Real-time PCR により解析した。*RAB27B* を *18S rRNA* で正規化した。(n = 4) .

さらにタンパク質レベルでの発現を解析するために、ウエスタンブロッティングを行った。タンパク質レベルにおいても、Rab27b は放射線照射後に上昇していることが確認された (図 9)。

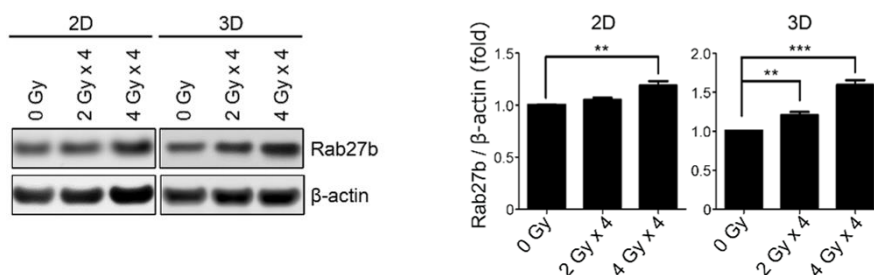


図 9 2D(Two-dimensional)または 3D lrECM で培養した U87MG 細胞において、放射線照射後の Rab27b のタンパク質発現レベルをウエスタンブロッティングにより測定した。Rab27b のバンド強度を β -actin のバンド強度で正規化した。(n = 3) .

興味深いことに、同じ Rab27 ファミリーである Rab27a の発現量は上昇していなかった (図 10)。

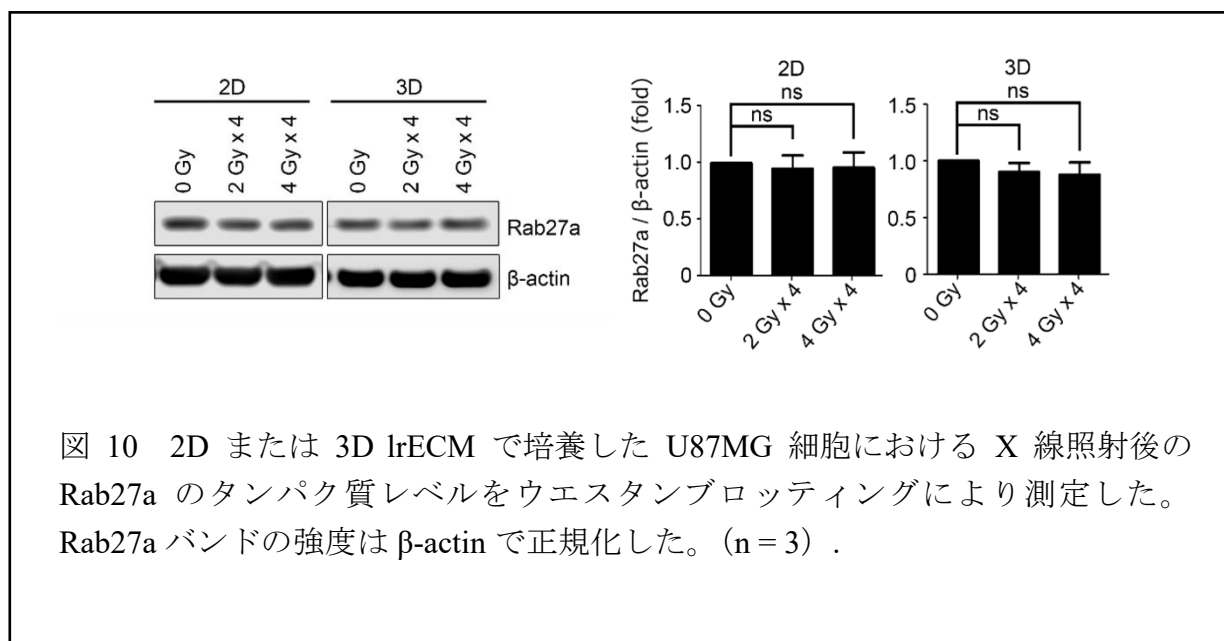


図 10 2D または 3D IrECM で培養した U87MG 細胞における X 線照射後の Rab27a のタンパク質レベルをウエスタンブロッティングにより測定した。Rab27a バンドの強度は β -actin で正規化した。(n = 3) .

なお、解析には Rab27a、Rab27b それぞれに特異的に認識することを確認した抗体を使用した (図 11)。Rab27a と Rab27b はアミノ酸配列の相同性が高いためか、市販されている抗体のいくつかは Rab27a と Rab27b を両方認識した (data not shown)。

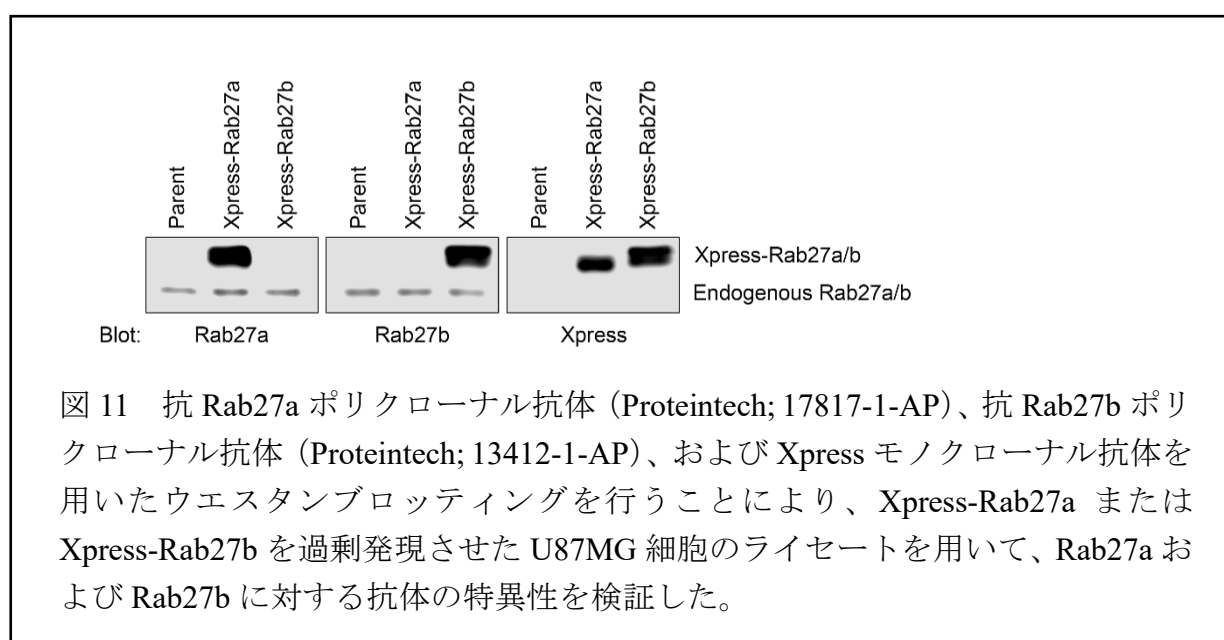


図 11 抗 Rab27a ポリクローナル抗体 (Proteintech; 17817-1-AP)、抗 Rab27b ポリクローナル抗体 (Proteintech; 13412-1-AP)、および Xpress モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングを行うことにより、Xpress-Rab27a または Xpress-Rab27b を過剰発現させた U87MG 細胞のライセートを用いて、Rab27a および Rab27b に対する抗体の特異性を検証した。

Rab27b の発現上昇は少なくとも一週間続いた (図 12)。

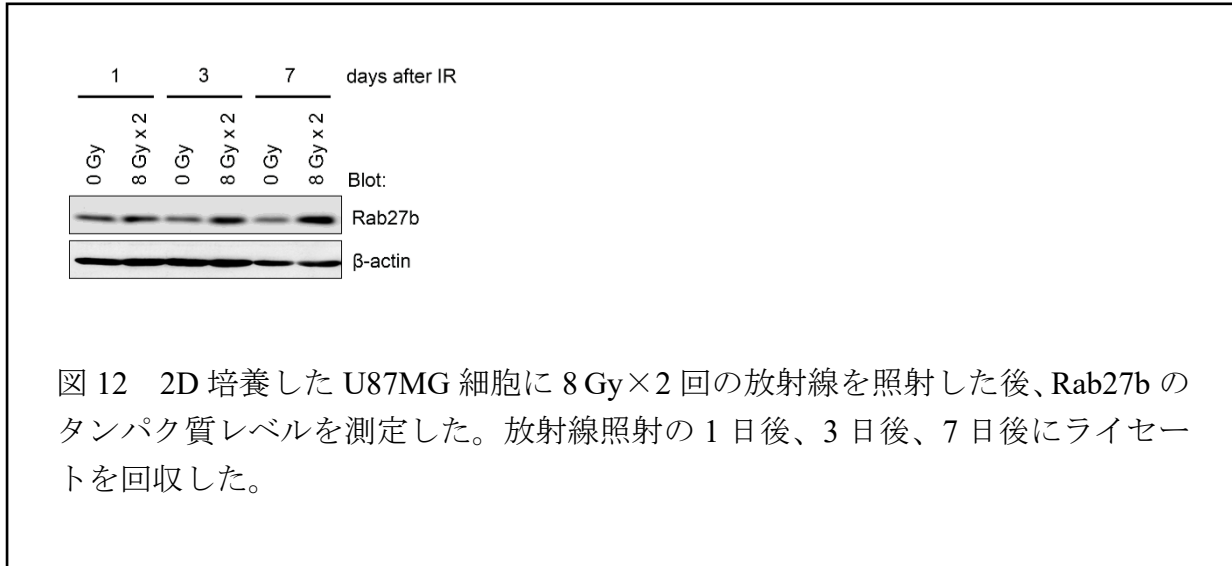


図 12 2D 培養した U87MG 細胞に 8 Gy×2 回の放射線を照射した後、Rab27b のタンパク質レベルを測定した。放射線照射の 1 日後、3 日後、7 日後にライセートを回収した。

ウェスウエスタンブロッティングと同様に、免疫蛍光染色においても、Rab27b の局在する小胞が放射線照射後に増加していることが確認された (図 13)。

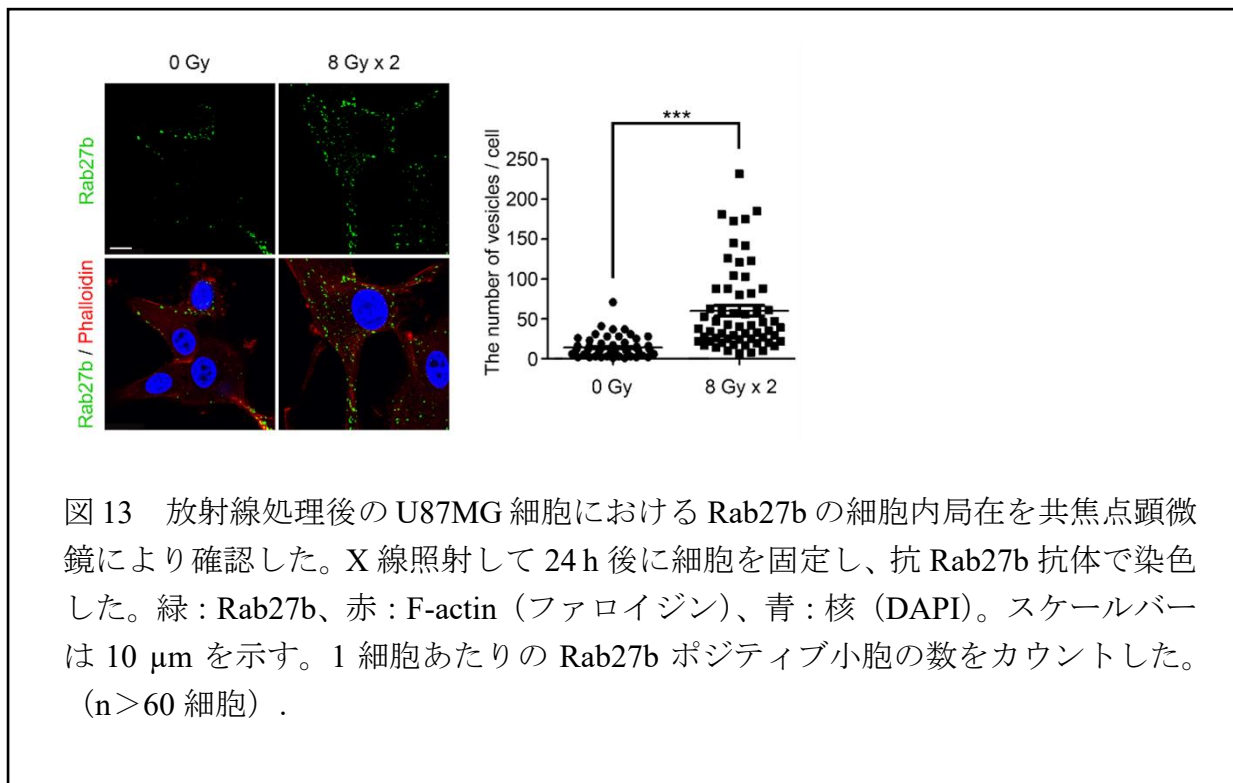


図 13 放射線処理後の U87MG 細胞における Rab27b の細胞内局在を共焦点顕微鏡により確認した。X 線照射して 24 h 後に細胞を固定し、抗 Rab27b 抗体で染色した。緑 : Rab27b、赤 : F-actin (ファロイジン)、青 : 核 (DAPI)。スケールバーは 10 μm を示す。1 細胞あたりの Rab27b ポジティブ小胞の数をカウントした。(n>60 細胞)。

放射線照射による Rab27b 発現の上昇は、他のグリオブラストーマ細胞株 U118MG においても確認された (図 14)。

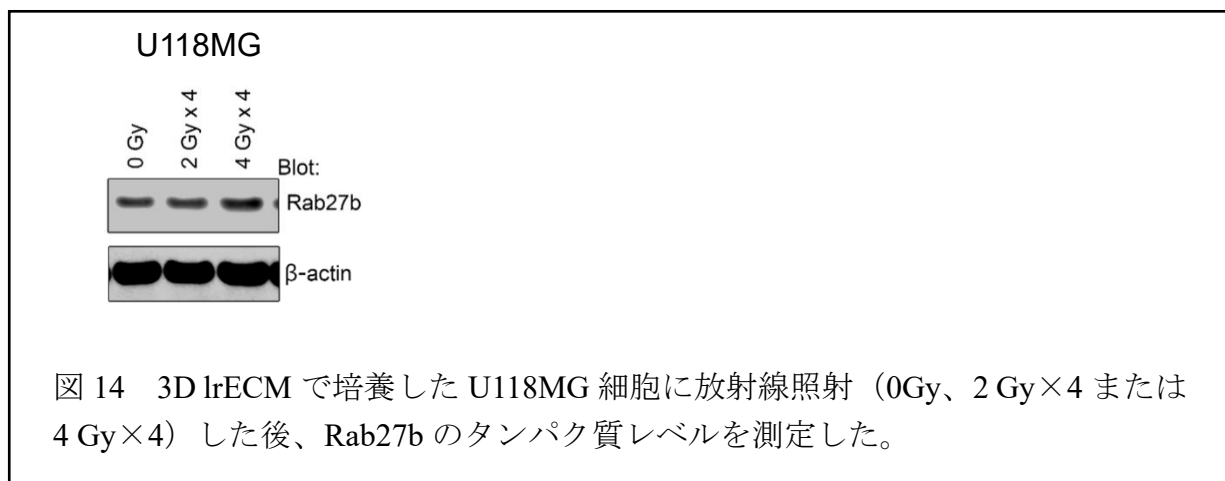


図 14 3D IrECM で培養した U118MG 細胞に放射線照射 (0Gy、2 Gy×4 または 4 Gy×4) した後、Rab27b のタンパク質レベルを測定した。

以上の結果から、放射線照射後の膠芽腫細胞において、Rab ファミリーのうち Rab27b が特に上昇しており、放射線応答において重要な役割を持つ可能性が示唆された。

1-3. Rab27b の発現抑制は U87MG 細胞の放射線感受性を高める

これまでの解析から、放射線照射後に発現が亢進するタンパク質が、がん細胞の生存に寄与することを見出してきた (Nam et al., 2010, 2013)。放射線照射後に亢進する Rab27b の役割を検証するために、U87MG 細胞における Rab27b を shRNA によりノックダウンした細胞を構築した。ウエスタンブロッティングにより、Rab27b の発現が抑制されていることを確認した (図 15)。

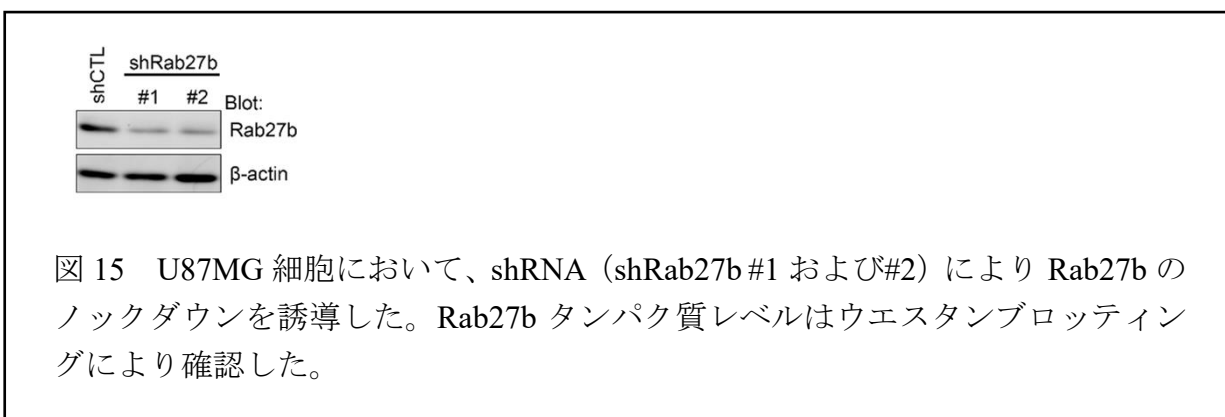


図 15 U87MG 細胞において、shRNA (shRab27b #1 および #2) により Rab27b のノックダウンを誘導した。Rab27b タンパク質レベルはウエスタンブロッティングにより確認した。

次に、Rab27b ノックダウン細胞における放射線照射後のアポトーシス誘導を解析するために、Annexin V による染色を行った。Annexin V はアポトーシスにより細胞膜の外側に露出した phosphatidylserine を検出するプローブである (Vermes et al., 1995)。U87MG 細胞のコントロール群と比較して、Rab27b ノックダウン群では、放射線処理後の Annexin V 染色が強まっており、アポトーシスの増加が示唆された (図 16)。

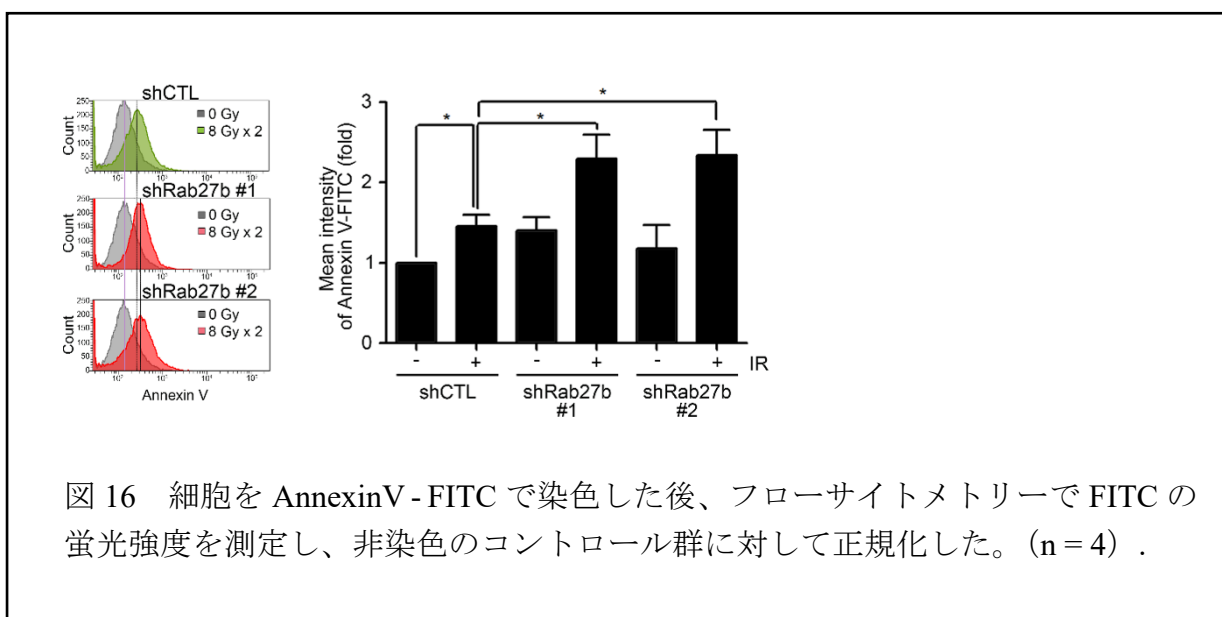


図 16 細胞を AnnexinV-FITC で染色した後、フローサイトメトリーで FITC の蛍光強度を測定し、非染色のコントロール群に対して正規化した。(n = 4) .

さらに、Rab27b をノックダウンすると、放射線照射後の細胞数が減少した (図 17)。

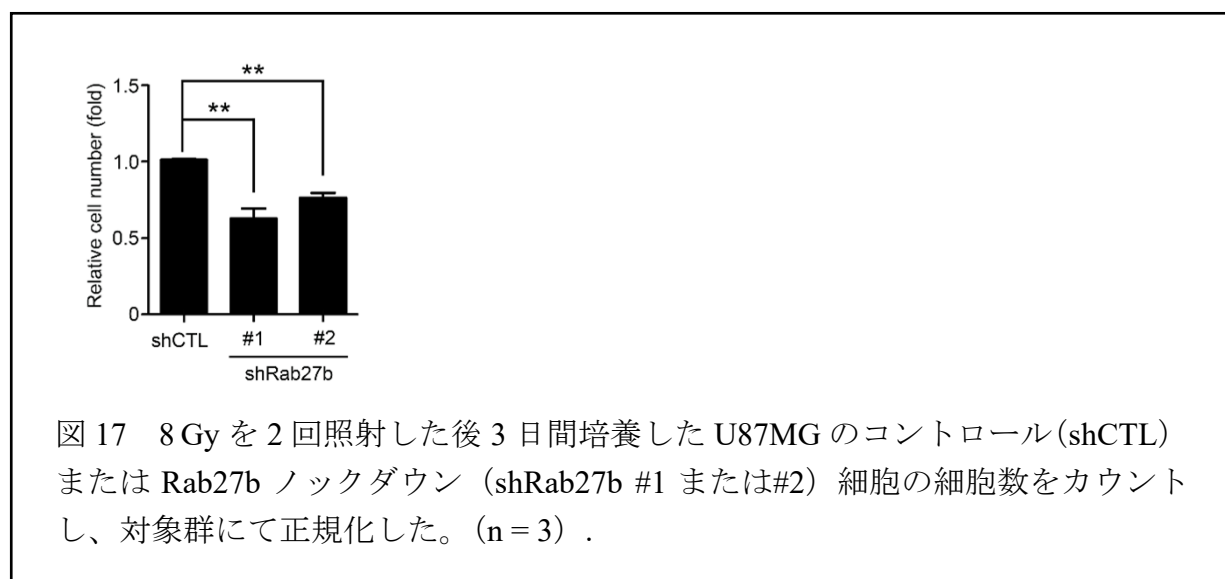
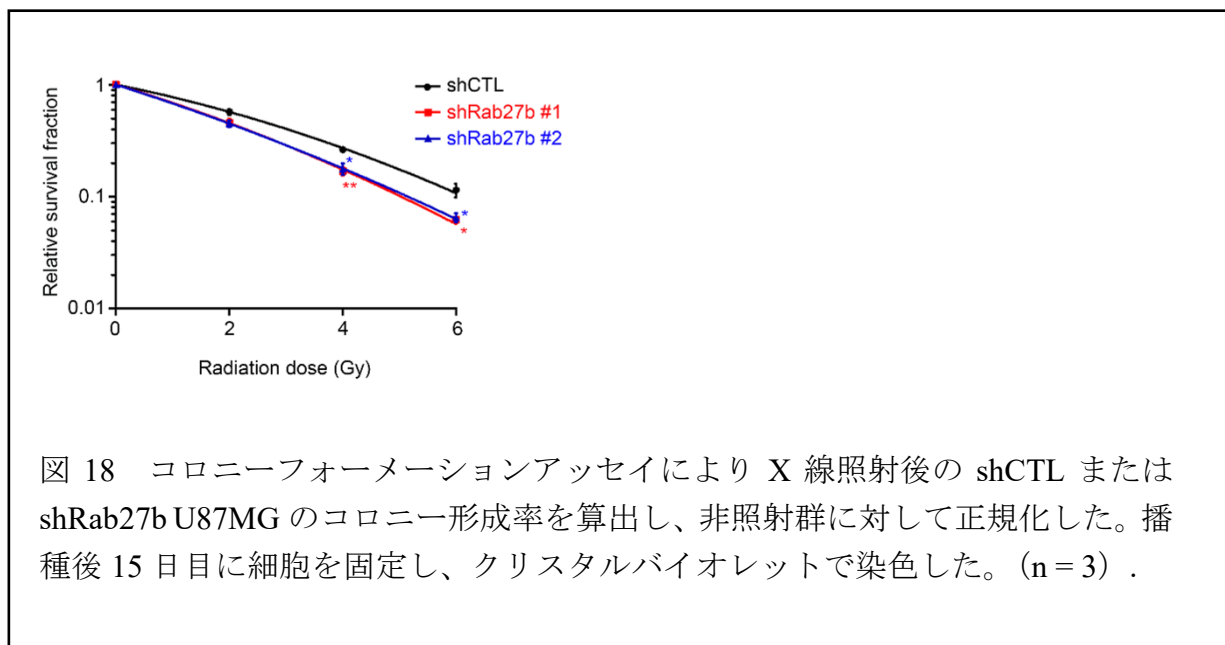
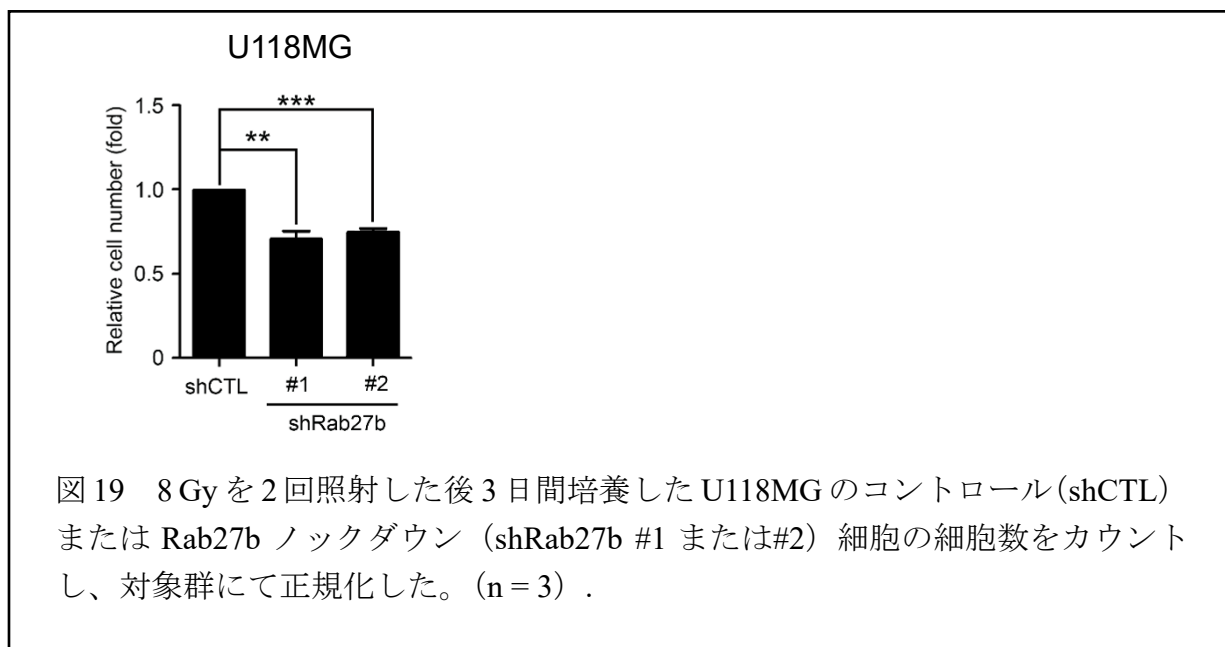


図 17 8 Gy を 2 回照射した後 3 日間培養した U87MG のコントロール (shCTL) または Rab27b ノックダウン (shRab27b #1 または #2) 細胞の細胞数をカウントし、対象群にて正規化した。(n = 3) .

また、Rab27b のノックダウンにより、放射線照射後のコロニー形成率が低下した (図 18)。



U118MG 細胞においても、Rab27b の抑制が放射線照射後の細胞生存率を減少させた (図 19)。



これらの結果から、Rab27b の抑制は、膠芽腫細胞の生存率を低下させることで放射線照射の効果を高めることが示唆された。

2 マウス脳腫瘍モデルにおける Rab27b の発現抑制効果の解析

2-1. Rab27b を抑制した U87MG-Luc 細胞の作成

生体内の発光を測定して腫瘍の大きさを調べるために、redshifted *Luciola italica* ルシフェラーゼを安定的に発現させた U87MG-Luc 細胞を作製した。さらに、U87MGLuc 細胞に、コントロールの shRNA 配列 (shCTL) または Rab27b #1 の shRNA 配列 (shRab27b) を持つプラスミドを導入した (図 20)。

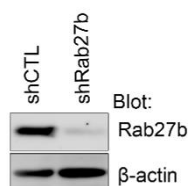


図 20 ウェスタンブロッティングにより U87MG-Luc 細胞における shRNA による Rab27b のノックダウンを確認した。

2-2. Rab27b の抑制は、X 線照射後における脳腫瘍の成長を遅らせる

次に、同所性異種移植マウスモデルにおいて膠芽腫の放射線抵抗性における Rab27b ノックダウンの効果を検証した。マウスの脳に U87MG-Luc 細胞をインジェクションし、照射群にはマウス全脳に 4 Gy 照射を 4 回行った。経時的に発光強度を測定して腫瘍の成長を解析した (図 21)。

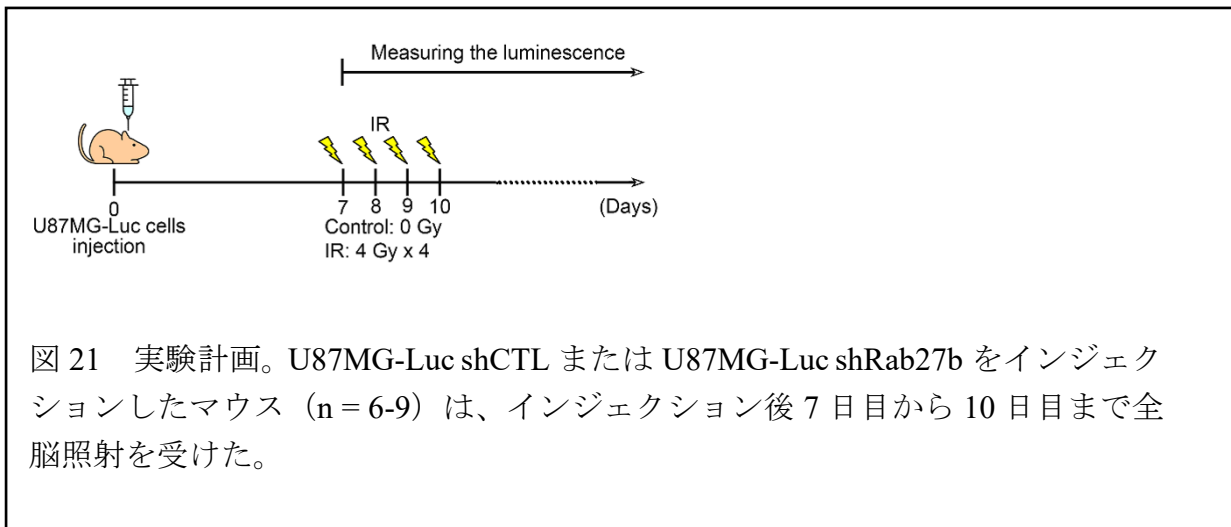


図 21 実験計画。U87MG-Luc shCTL または U87MG-Luc shRab27b をインジェクションしたマウス (n = 6-9) は、インジェクション後 7 日目から 10 日目まで全脳照射を受けた。

Rab27b のノックダウンのみでも、腫瘍の成長を遅らせた。X 線照射を組み合わせることで、さらに腫瘍の成長が遅くなった (図 22)。

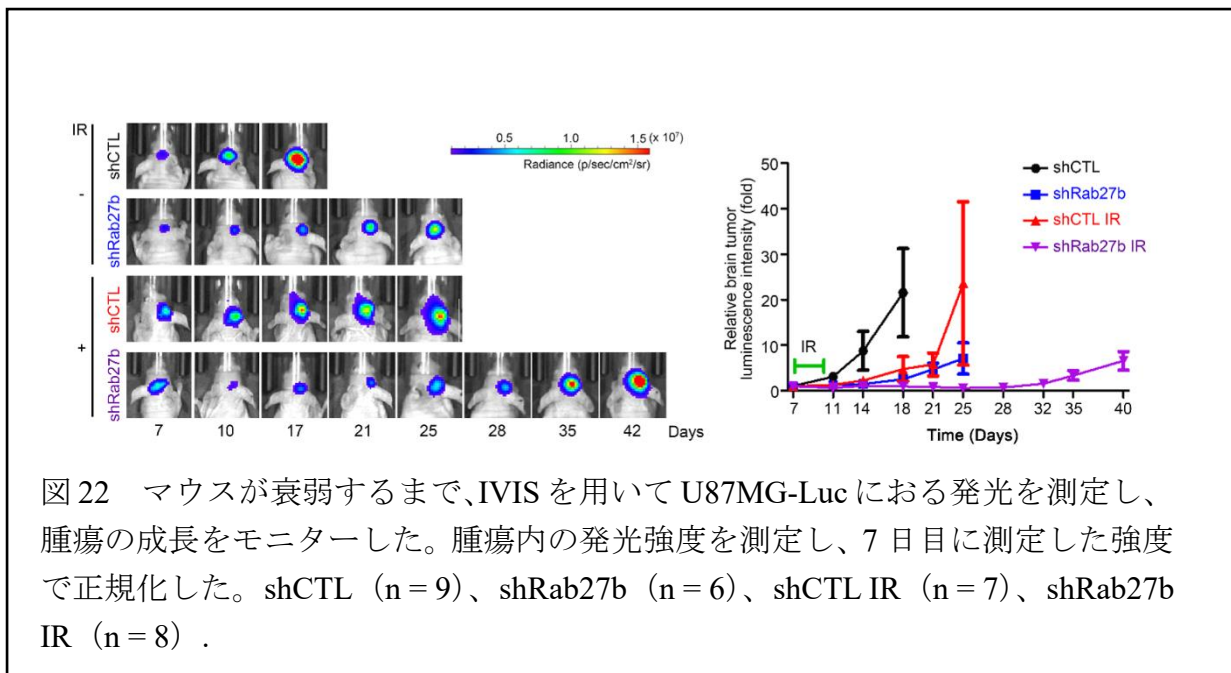
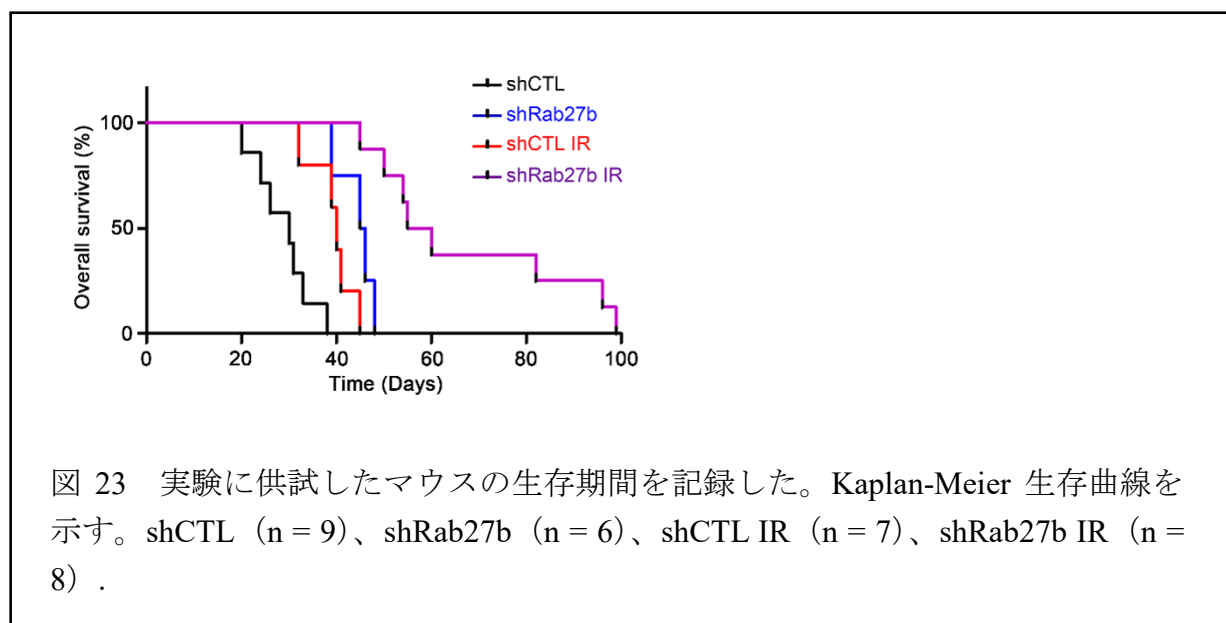


図 22 マウスが衰弱するまで、IVIS を用いて U87MG-Luc における発光を測定し、腫瘍の成長をモニターした。腫瘍内の発光強度を測定し、7 日目に測定した強度で正規化した。shCTL (n = 9)、shRab27b (n = 6)、shCTL IR (n = 7)、shRab27b IR (n = 8) .

2.3 Rab27b の抑制は、X 線照射後におけるマウスの生存期間を延長する

腫瘍の成長をモニターしながらマウスの生存期間を測定したところ、Rab27b の抑制はマウスの生存期間を延長させた。Rab27b の抑制と X 線照射の組み合わせは、さらにマウスの生存期間を延長させた (図 23)。



重要なことに、放射線照射と Rab27b ノックダウンを併用することで、各処理の効果を各群で加算した値よりも大きい相乗効果が得られた (図 22、23)。これらの結果は、Rab27b が膠芽腫の放射線抵抗性に寄与していることを強く示唆している。

3. 神経膠腫細胞における Rab27b と EREG の発現解析

3-1. EREG の発現は Rab27 の発現と相関している

Rab27b は、細胞外への小胞輸送を制御し、様々な物質の輸送に貢献する。成長因子もその制御を受けて分泌され、受容体に結合し細胞の生存や増殖に関わるパスウェイを活性化させる (Kariya et al., 2011; Tsuruda et al., 2020)。我々は、Rab27b と発現が相関している分泌タンパク質を特定することを試みた。前述のマイクロアレイデータと膠芽腫の TCGA データベース (RNA-seq) による解析をもとに、分泌タンパク質の mRNA レベルを調べた。放射線照射後に mRNA 発現が増加 (マイクロアレイ) (図 24) し、Rab27b の発現と相関している (TCGA) (図 25、26) ことから、私たちは EREG に着目した。

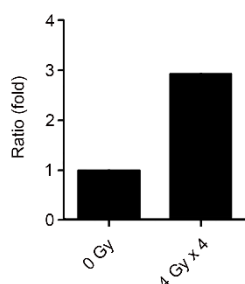


図 24 3D IrECM で培養した U87MG 細胞における EREG の発現を cDNA マイクロアレイにより解析した。

EREG はグリオーマの進行や腫瘍の成長に関与していると言われている (Auf et al., 2013; Kohsaka et al., 2014)。TCGA の解析によると、*RAB27A* または *RAB27B* の発現レベルが高いグループでは、低いグループに比べて EREG の発現が有意に高かった。注目すべきは、*RAB27A* と *RAB27B* の両方の発現が高いグループは、EREG の発現がより高く、さらに予後の悪さと相関していたことである。(図 25)。

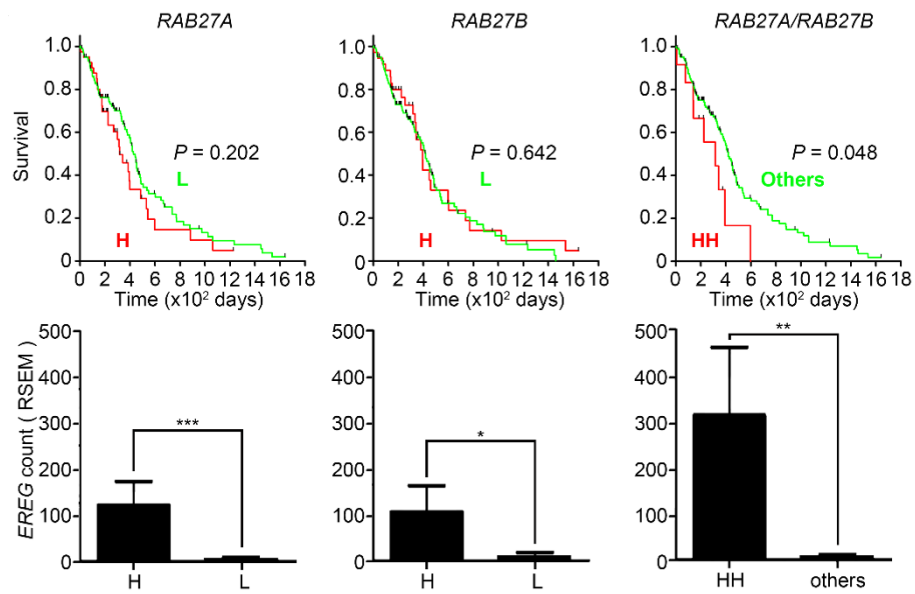


図 25 160 人の膠芽腫患者の TCGA RNA-seq データを用いて、*RAB27A* または *RAB27B* の発現を単独または組み合わせて層別化した患者について、Kaplan-Meier 生存曲線を作成した (上段)。また、各グループにおける EREG カウントの平均値を算出した (下段)。H, high; L, low; HH, *RAB27A/RAB27B*-high/high. Brunner-Munzel test.

マイクロアレイにより解析された別の膠芽腫におけるデータセットでも同様の結果が得られた (図 26)。

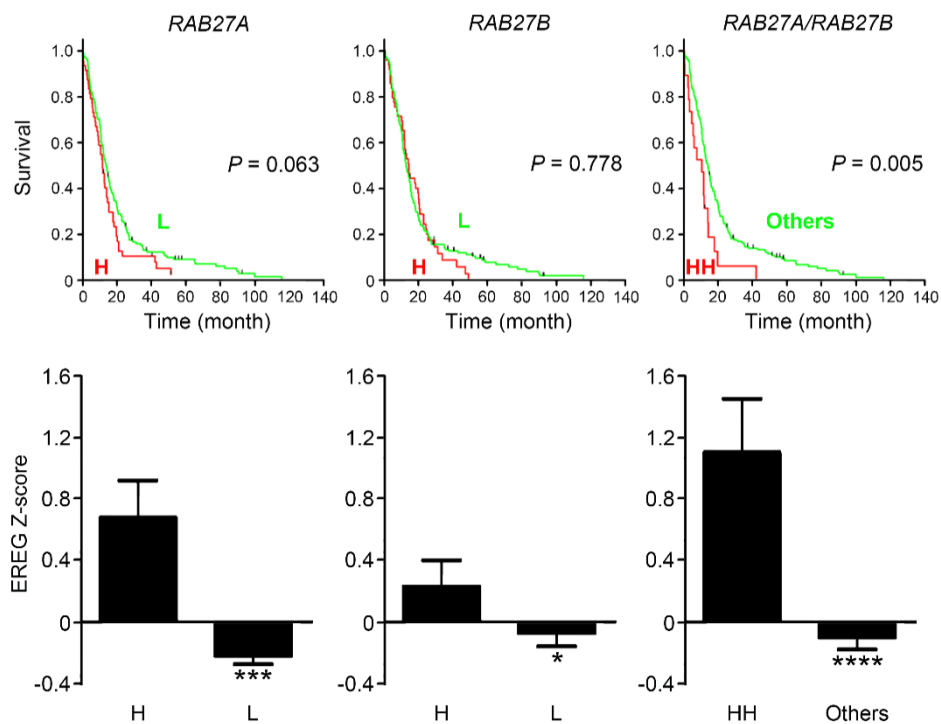


図 26 別のデータセットを用いた TCGA 解析。膠芽腫患者 206 人の TCGA マイクロアレイデータを用いて、*RAB27A* または *RAB27B* の発現レベルを単独または組み合わせて層別化した患者について、Kaplan-Meier 生存曲線（上段）を作成した。また、各グループにおける EREG の平均 Z スコアを算出した（下段）。H, high; L, low; HH, *RAB27A/RAB27B*-high/high. Brunner-Munzel test.

グリオーマ細胞株における EREG と Rab27 の発現をさらに評価するために、H4（神経膠腫）、SW1088（星細胞腫）、A172（膠芽腫）、U118MG（膠芽腫）、U87MG（膠芽腫）の各細胞におけるタンパク質レベルを分析した。低悪性度グリオーマ細胞である H4 細胞は、2D 培養では上皮細胞様の表現型を示したが、他の細胞株は 2D および 3D 培養の両方で線維芽細胞様の表現型を示した（図 27）。

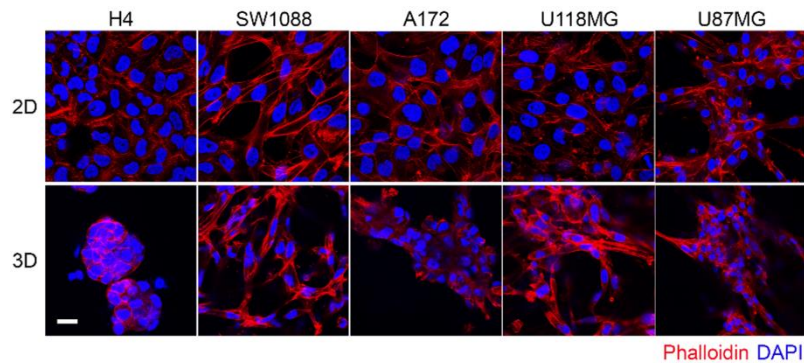


図 27 2D または 3D IrECM 培養下の 5 つのグリオーマ細胞株 H4、SW1088、A172、U118MG、U87MG の形態を示す免疫蛍光画像。赤：F-actin（ファロイジン）、青：核（DAPI）。スケールバーは 25 μm を示す。

REG タンパク質は、2D および 3D 培養の両方において、Rab27a と Rab27b の両方を高レベルで発現している U87MG 膠芽腫細胞株で、H4 よりも高レベルで発現していた（図 28）。これらの結果は、REG が Rab27b の発現と相関関係にあることを示唆している。

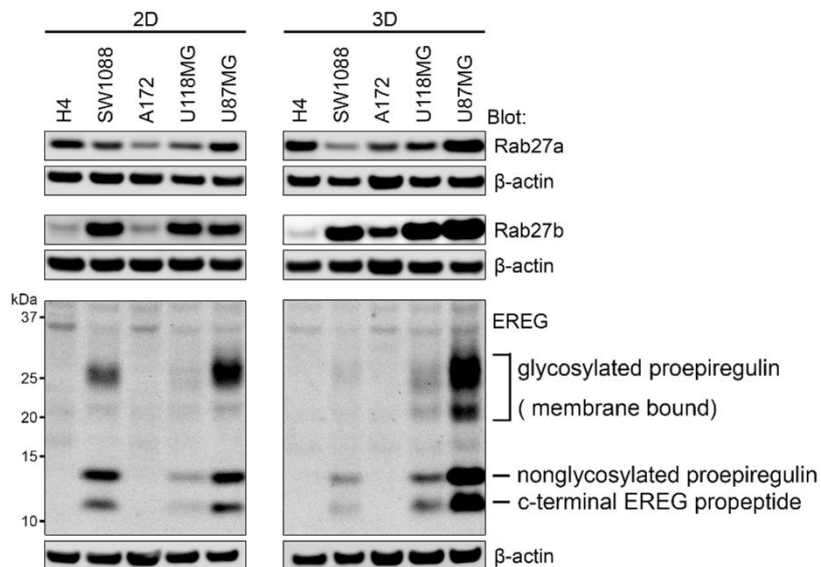


図 28 5 つのグリオーマ細胞株における Rab27b と EREG のタンパク質レベルをウエスタンブロッティングにより解析した。

3-2. Rab27b と EREG の間には正のフィードバックが存在する

EREG の発現パターンは、5 つのグリオーマ細胞株において、Rab27a よりも Rab27b と密接に相関しており、U87MG 細胞では EREG が大幅に上昇していた。次に、RNA 干渉および過剰発現により、EREG と Rab27b の発現を抑制または上昇させた U87MG における Rab27b と EREG の発現を調べた。siRNA により Rab27b のノックダウンをしたところ、U87MG 細胞の EREG のタンパク質レベルが低下した (図 29)。

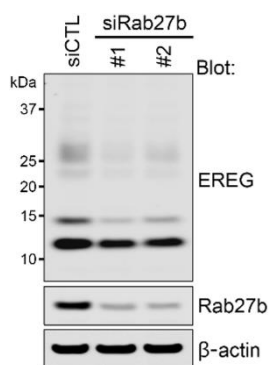


図 29 siRab27b または siCTL をトランスフェクションした U87MG 細胞のライゼートにおける EREG の発現レベルを測定した。

逆に、**EREG** ノックダウンは、**Rab27b** のタンパク質レベルを低下させた(図 30)。

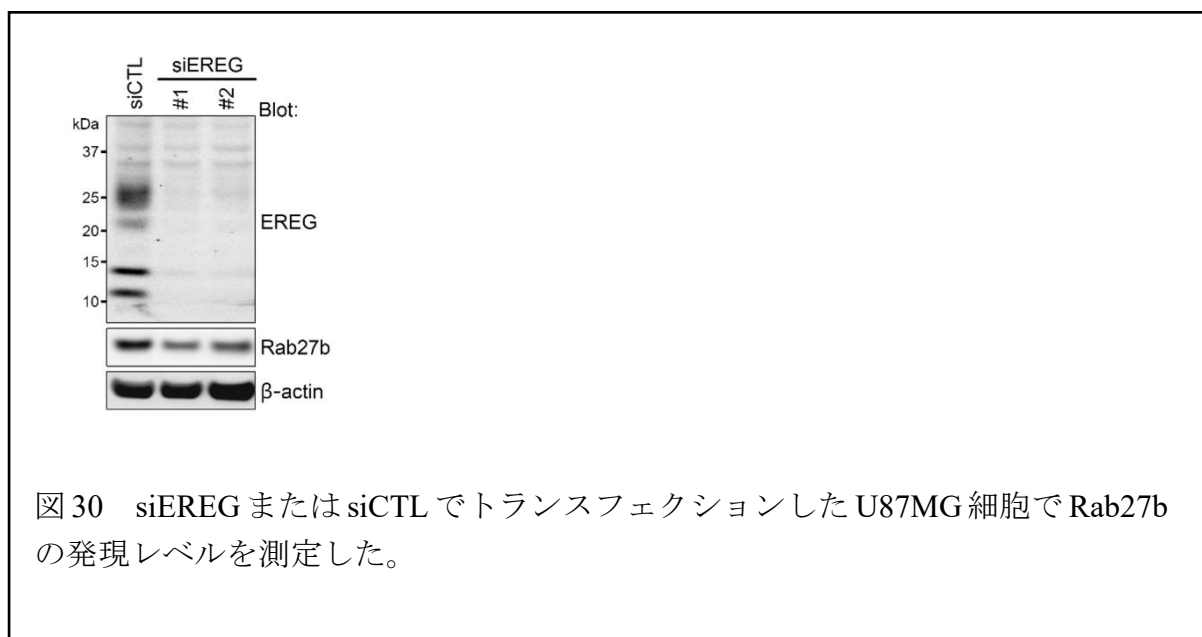


図 30 siEREG または siCTL でトランスフェクションした U87MG 細胞で Rab27b の発現レベルを測定した。

U87MG 細胞および U118MG 細胞では、外因性の **Rab27b** または **EREG** の過剰発現により、それぞれ **EREG** および **Rab27b** のタンパク質発現が増加した。(図 31)

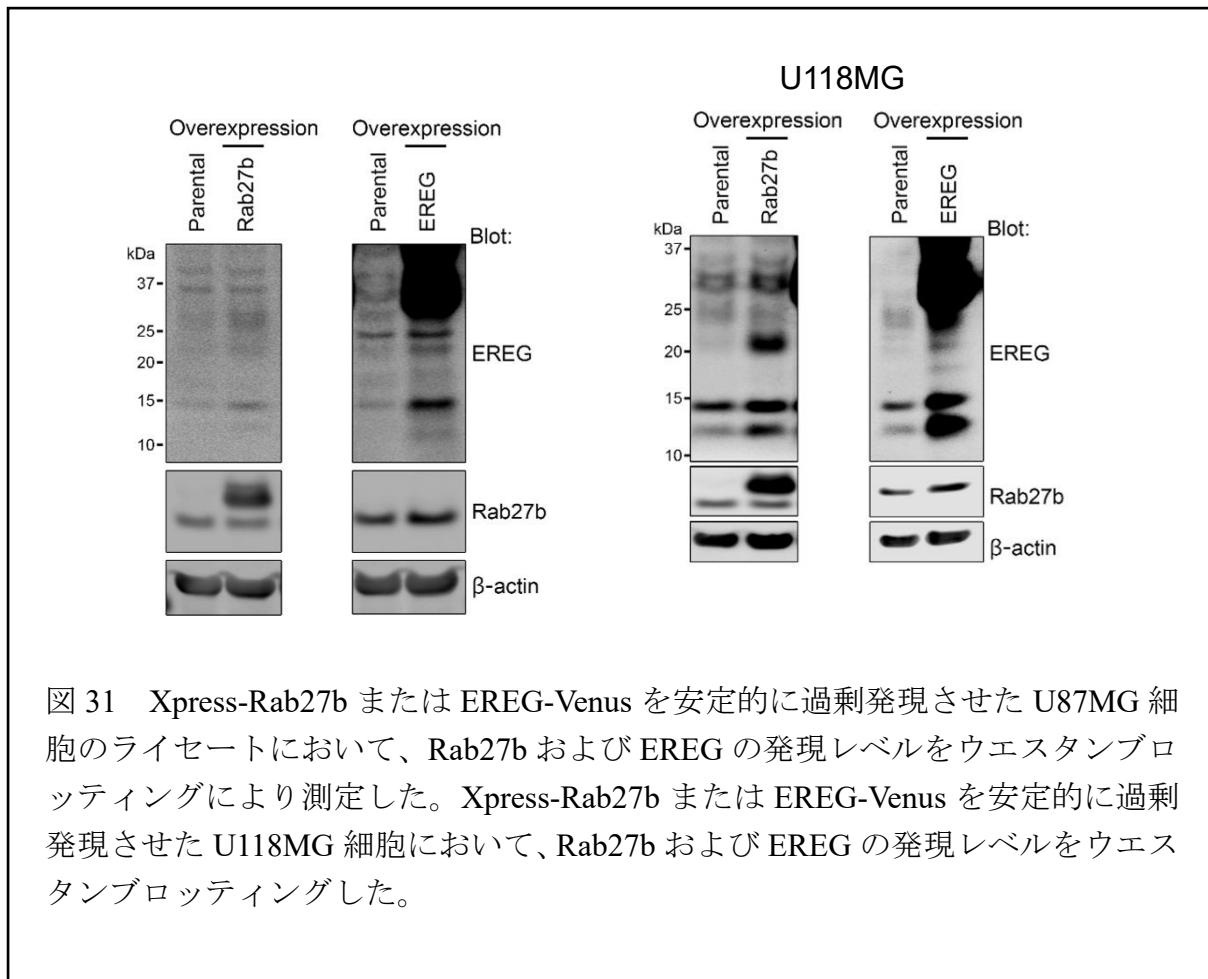


図 31 Xpress-Rab27b または EREG-Venus を安定的に過剰発現させた U87MG 細胞のライセートにおいて、Rab27b および EREG の発現レベルをウエスタンブロッティングにより測定した。Xpress-Rab27b または EREG-Venus を安定的に過剰発現させた U118MG 細胞において、Rab27b および EREG の発現レベルをウエスタンブロッティングした。

これらの結果は、Rab27b と EREG の発現を制御する正のフィードバックループがあることを示唆している。

4. EREG および Rab27b を介する放射線抵抗性の解析

4-1. EREG は放射線照射後に亢進する

図 9 に示した放射線照射による Rab27b の亢進と同様に、EREG のタンパク質発現は、U87MG 細胞および U118MG 細胞で X 線照射後に上昇していた (図 32)。

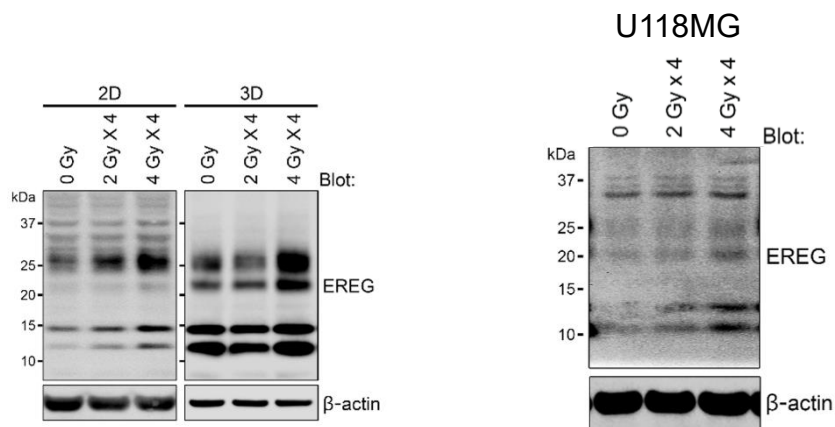


図 32 (左) X 線照射後の U87MG 細胞における EREG のタンパク質レベルをウエスタンブロッティングで測定した。(右) 3D 1rECM で培養した U118MG 細胞に放射線照射 (0 Gy、2 Gy×4 または 4 Gy×4) した後、EREG のタンパク質レベルを測定した。

Rab27b と同様に、EREG 発現の増加は、照射後少なくとも 1 週間は持続した (図 33)。

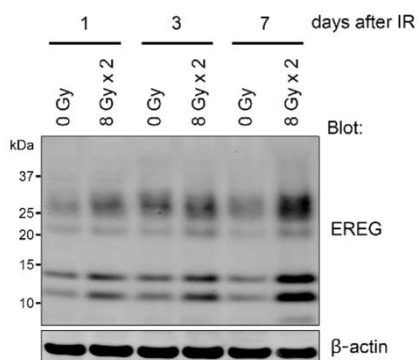
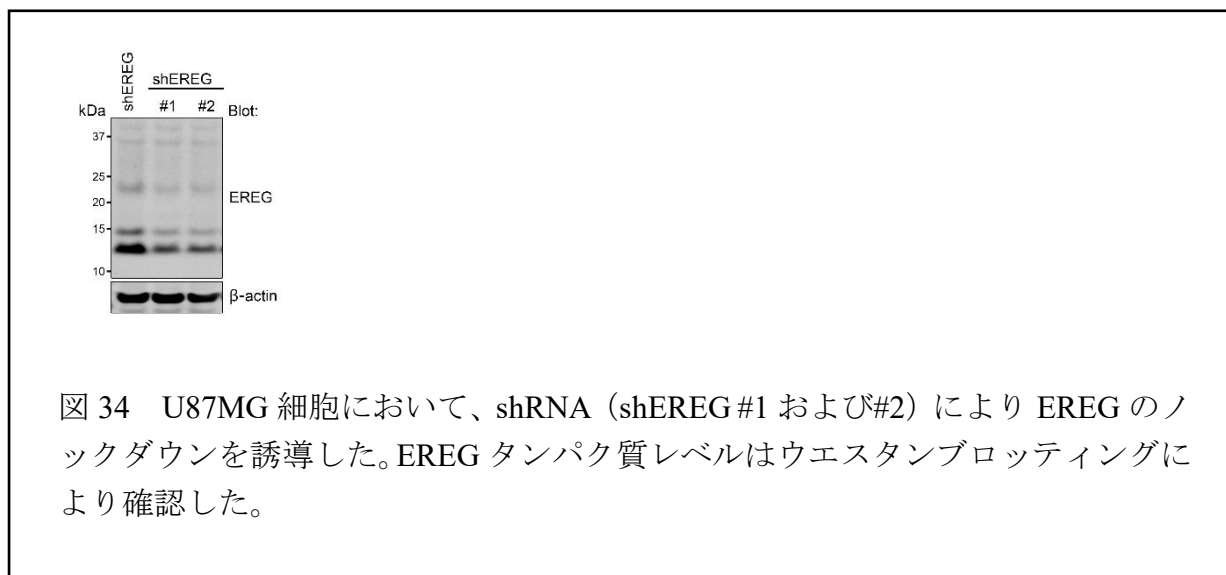


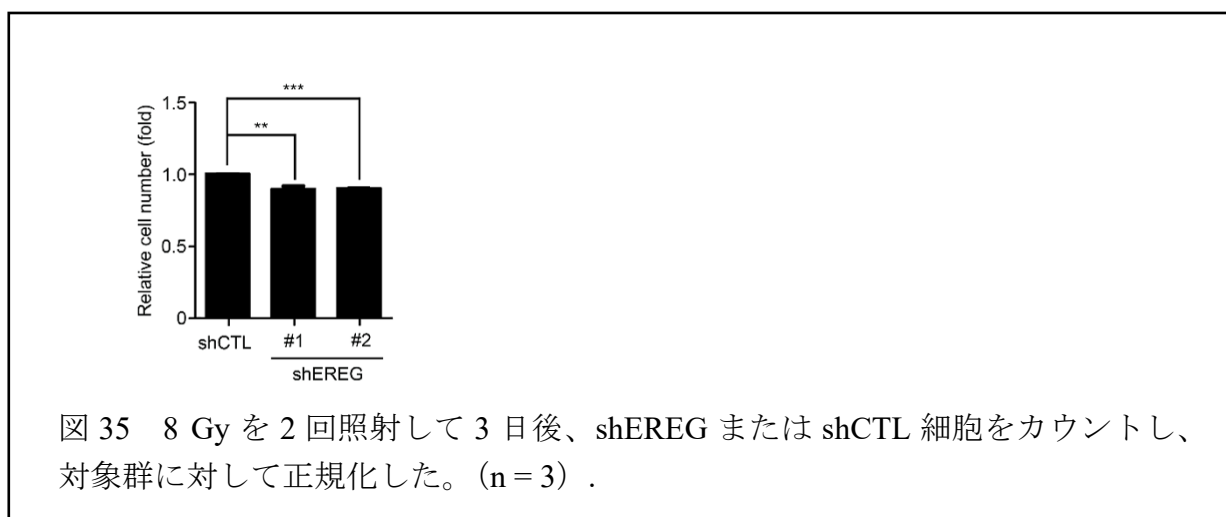
図 33 2D 培養した U87MG 細胞に分割 X 線照射した後、EREG のタンパク質レベルを測定した。X 線照射して 1 日後、3 日後、7 日後に細胞溶解液を採取した。

4-2. EREG は放射線抵抗性に寄与する

shRNA により EREG をノックダウンした U87MG 細胞を作成した (図 34)。

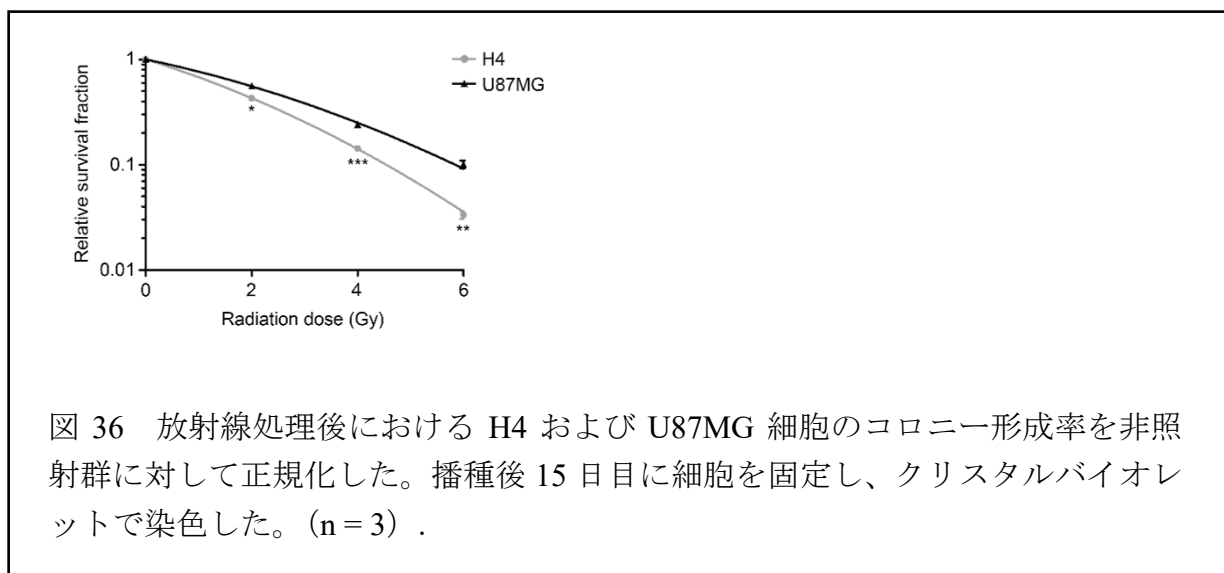


放射線照射を受けた U87MG 細胞の細胞数は、EREG を抑制した群でわずかながら減少した (図 35)。

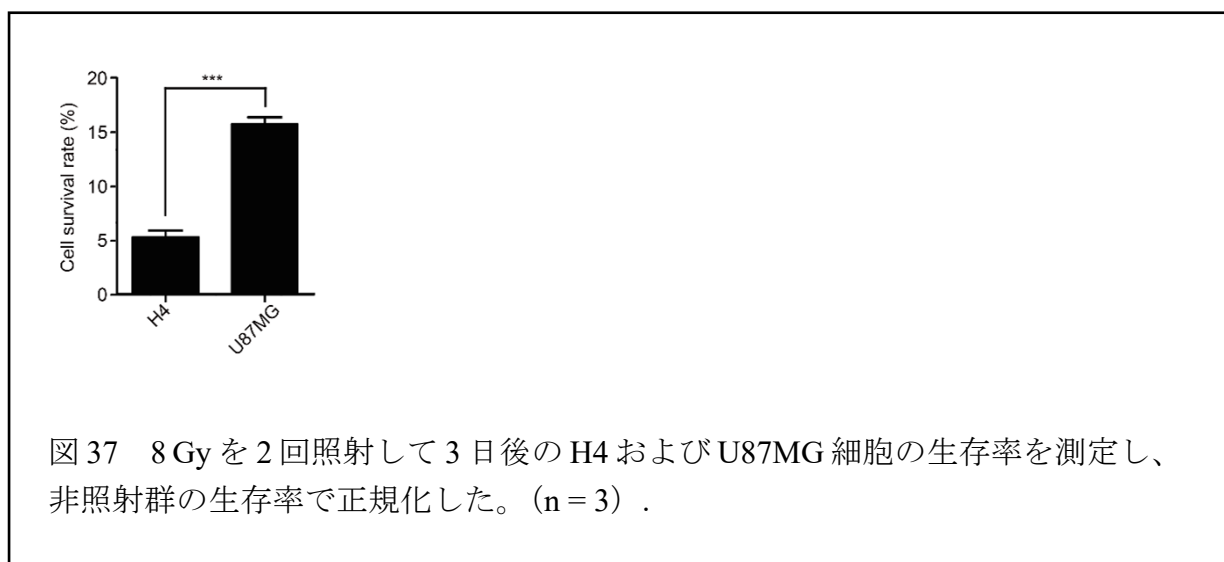


次に、図 28 において Rab27b および EREG の高レベルな発現を示した U87MG と、両者の低レベルな発現を示した H4 の放射線抵抗性を比較した。放射線照

射後のコロニー形成率は、U87MG 細胞の方が H4 細胞よりも高かった (図 36)。



また、放射線照射後の細胞生存率は、U87MG 細胞の方が H4 細胞よりも高かった (図 37)。



さらに、放射線への抵抗性が比較的低い H4 細胞において、Rab27b または EREG のいずれかを外因性に過剰発現させることで、放射線抵抗性の上昇がみられた (図 38)。

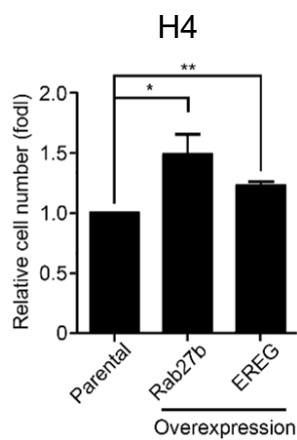


図 38 Xpress-Rab27b または EREG-Venus を H4 細胞で恒常的に過剰発現させた。8 Gy を 2 回照射した後の細胞生存率を細胞計数により解析した。(n = 3)。

一方、U87MG 細胞では、これらのタンパク質を過剰発現させても、放射線抵抗性のさらなる上昇はみられなかった (図 39)。

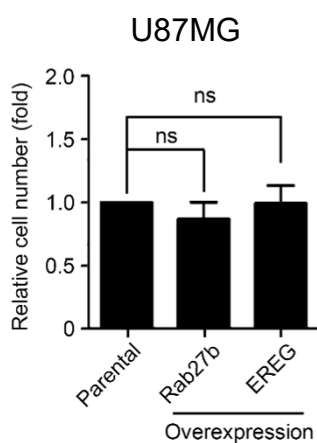


図 39 Xpress-Rab27b または EREG-Venus を U87MG 細胞で安定的に発現させ、放射線処理後の細胞生存率を細胞計数により解析した。(n = 3)。

次に、図 23 における放射線照射後のマウス脳腫瘍において、Rab27b と EREG のタンパク質レベルを IHC で確認した。放射線照射後の腫瘍において、Rab27b と EREG の発現が増加していた。重要なことに、Rab27b のノックダウンは、Rab27b だけでなく、放射線照射で誘発された EREG の発現も抑制した。この結果は、Rab27b が EREG の発現を制御することを示す (図 40)。これらのデータは、放射線が Rab27b と EREG の共亢進を誘導し、グリオーマ細胞の放射線抵抗性に寄与することを示唆している。

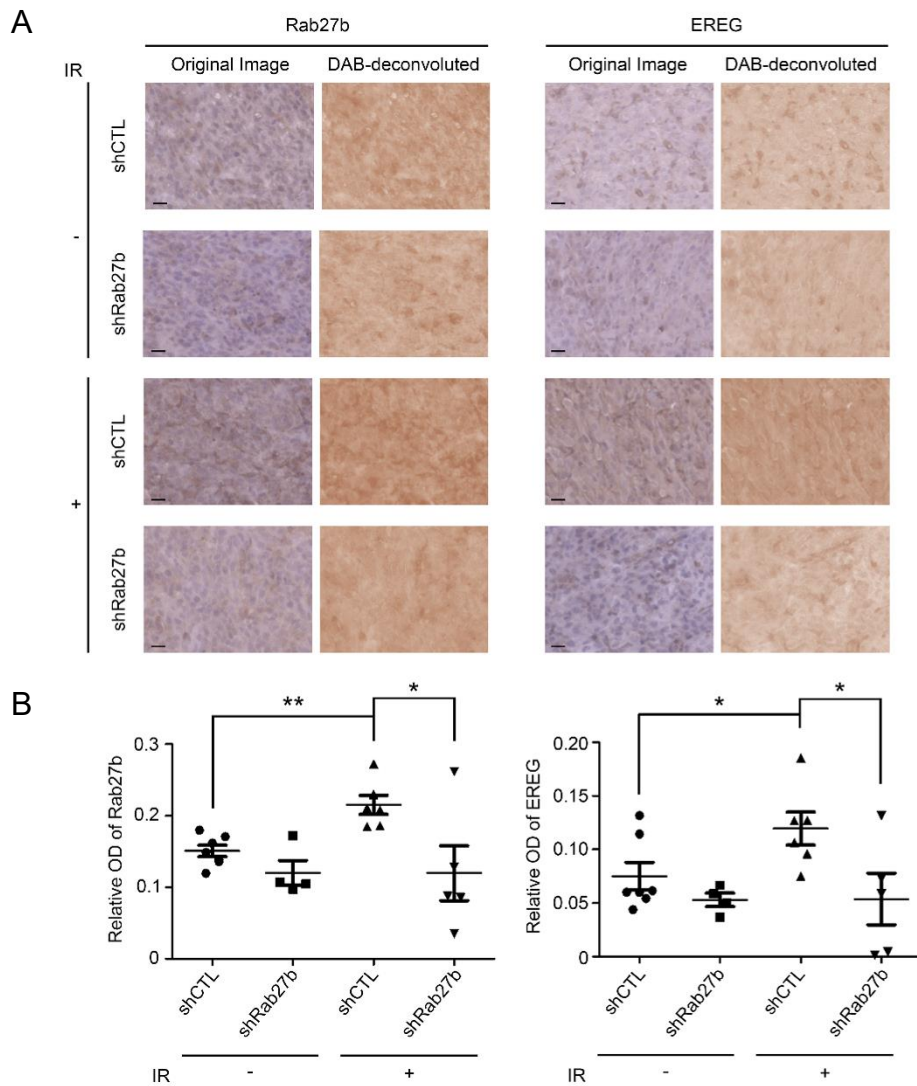


図 40 (A) マウス脳腫瘍における Rab27b または EREG の IHC 画像。画像は Fiji を用いて DAB 画像に color-deconvolution した。スケールバーは 20 μm を示す。(B) Fiji を用いて光学密度 (OD) を定量化した。Relative OD は以下のように計算した。(一次抗体により染色した DAB 像の OD) - (一次抗体による染色なしの DAB 像の OD)。shCTL (n = 7)、shRab27b (n = 4)、shCTL IR (n = 6)、shRab27b IR (n = 5)。

5. Rab27b と EREG を介するパラクライン効果の解析

膠芽腫では、同一腫瘍内に複数の細胞サブタイプが共存していることが知られている。治療への感受性がサブタイプにより異なるため、腫瘍内不均一性は効果的な治療を確立する上で困難な障壁であると考えられている (Ou et al., 2020; Sottoriva et al., 2013)。不均一な腫瘍内細胞集団において、がん細胞から分泌されるタンパク質や小胞が隣接する細胞の生存や増殖に影響を与える (Soeda et al., 2015; Son et al., 2017)。分泌タンパク質である EREG は、腫瘍の進行をパラクライン的に制御することが報告されている (Neufert et al., 2013; Vlaicu et al., 2013)。そこで、U87MG 細胞が放射線処理後に Rab27b 経路を介して EREG を分泌することが、異なる種類のグリオーマ細胞、特に低悪性度で放射線感受性の高い H4 細胞株に対してパラクライン効果を発揮するかを評価した。

5-1. 放射線による Rab27b-EREG 経路の亢進は EGFR を活性化する

EREG は、膜貫通型の Proepiregulin として合成され、その後、Proepiregulin は、細胞膜に結合する C 末端ペプチドと、細胞外に放出される成熟型のペプチドに分解される。成熟した EREG は EGFR に結合し、EGFR シグナルを活性化する (Baba et al., 2000; Kohsaka et al., 2014)。組換え EREG または U87MG 細胞の馴化培地で処理した H4 細胞におけるリン酸化 EGFR (p-EGFR) レベルを評価することで、パラクライン効果を調べた。組換え EREG の効果と同様に、U87MG 細胞の馴化培地で処理した H4 細胞では p-EGFR レベルが上昇した (図 41)。

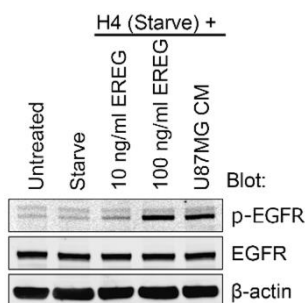


図 41 10 ng/mL または 100 ng/mL の EREG または U87MG 細胞の馴化培地で 10 min 刺激した。EGFR のリン酸化を、p-EGFR (Tyr1068) に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングにより測定した。

さらに、X線を照射したU87MG細胞からの培地で処理したH4細胞では、非照射細胞からの培地と比較して、EGFRのリン酸化が線量依存的に増加した（図42）。

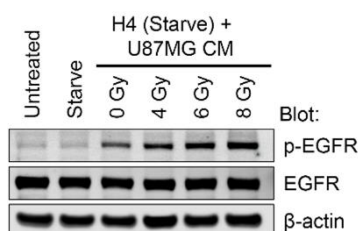


図42 H4細胞を無血清培地で16hインキュベートした後、放射線照射の24h後に採取したU87MG細胞の馴化培地でH4細胞を10min刺激した。EGFRのリン酸化をウエスタンブロッティングにより測定した。

REGをノックダウンしたU87MG細胞の馴化培地で処理した細胞では、コントロール細胞の馴化培地で処理した細胞に比べてp-EGFRレベルが低下していた（図43）。

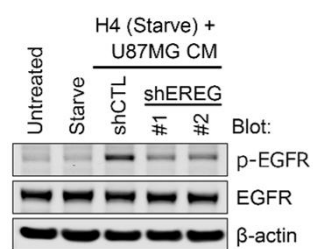


図43 H4細胞をREGノックダウン細胞(shEREG#1または#2)または(shCTL)U87MG細胞の馴化培地で刺激した。EGFRのリン酸化をウエスタンブロッティングにより測定した。

同様の結果は、Rab27bをノックダウンしたU87MG細胞の培養液で処理した細胞でも得られた（図44）。

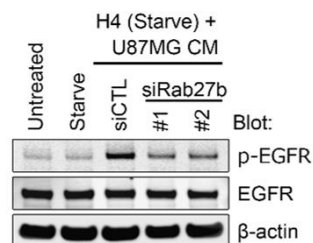


図 44 H4 細胞を、siRab27b または siCTL をトランスフェクションした U87MG 細胞の馴化培地で刺激した。EGFR のリン酸化をウエスタンブロッティングにより測定した。

これらの結果から、U87 MG 細胞において、放射線照射後に応じて亢進した Rab27b による制御を受ける EREG は、H4 細胞で EGFR を活性化することが示唆された。

5-2. 共培養系 による Rab27b-EREG パラクライン効果の解析

次に、放射線照射を受けた U87MG 細胞が H4 細胞の増殖に及ぼすパラクライン効果を、2D および 3D 共培養システムを用いて解析した。2D 共培養では、インサートに H4 または U87MG 細胞を播種し、プレートに播種した H4 細胞と共培養した後、プレートの細胞数を測定した (図 45)。

2D Coculture System

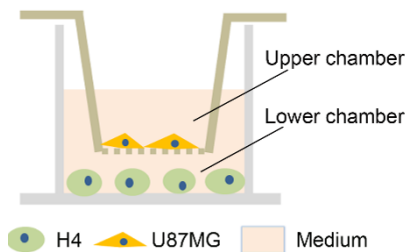


図 45 2D 共培養システムの実験モデル。H4 細胞または前処理した U87MG 細胞を Transwell インサート（上部チャンバー）に播種した。U87 細胞を siRNA で 24 h インキュベートした。上部チャンバーに放射線を照射し、H4 細胞を播種した 6 ウェルプレートに設置した（下部チャンバー）。3 日間の共培養後、下部チャンバー内の H4 細胞数を測定した。

U87MG 細胞と共培養した H4 細胞は、H4 細胞と共培養したものよりも細胞数が増加した。さらに、放射線照射を受けた U87MG 細胞と共培養した H4 細胞は、非照射 U87MG 細胞と共培養した H4 よりも増殖が亢進していた（図 46）。

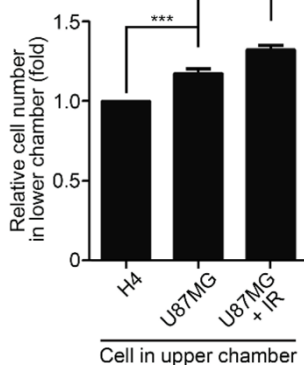
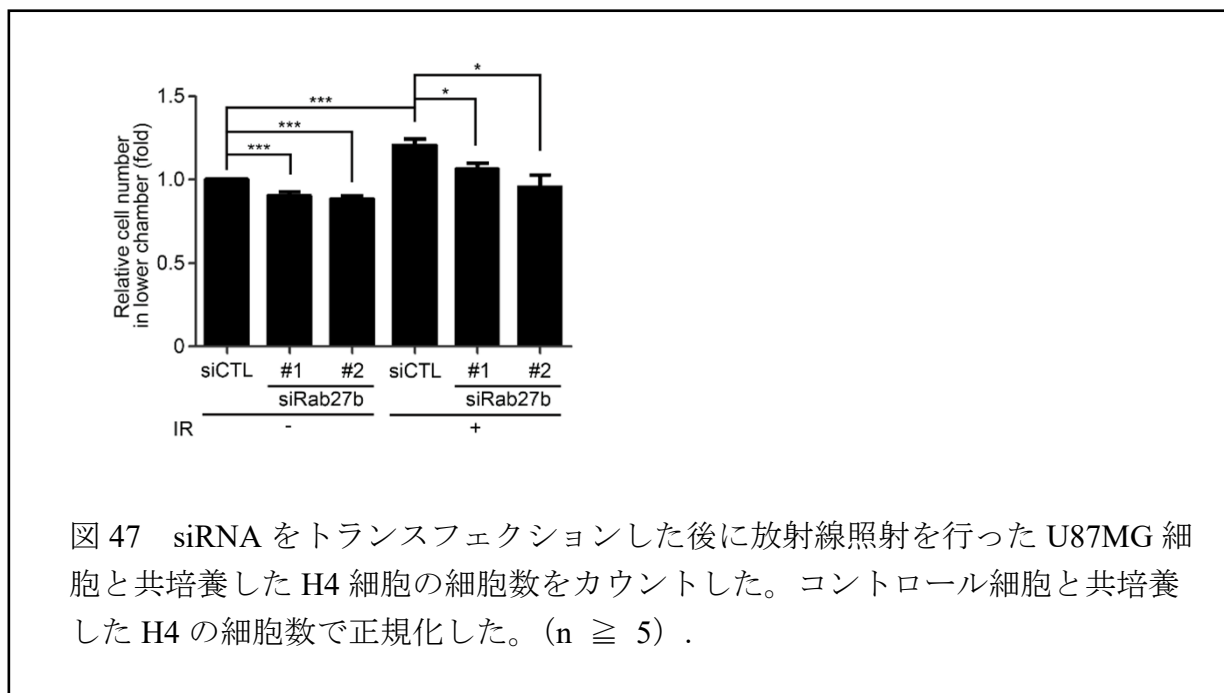
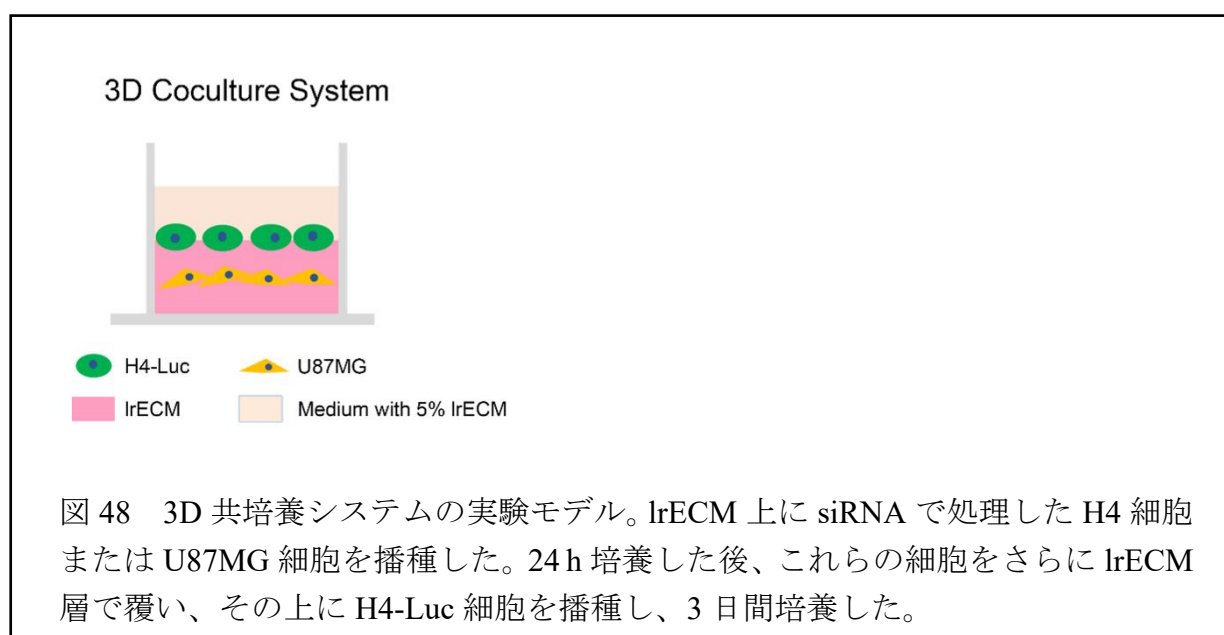


図 46 H4、U87MG、または 8 Gy 照射した U87MG 細胞と共培養した H4 細胞の数をカウントし、H4 細胞と共培養した H4 細胞に対して正規化した。(n = 4) .

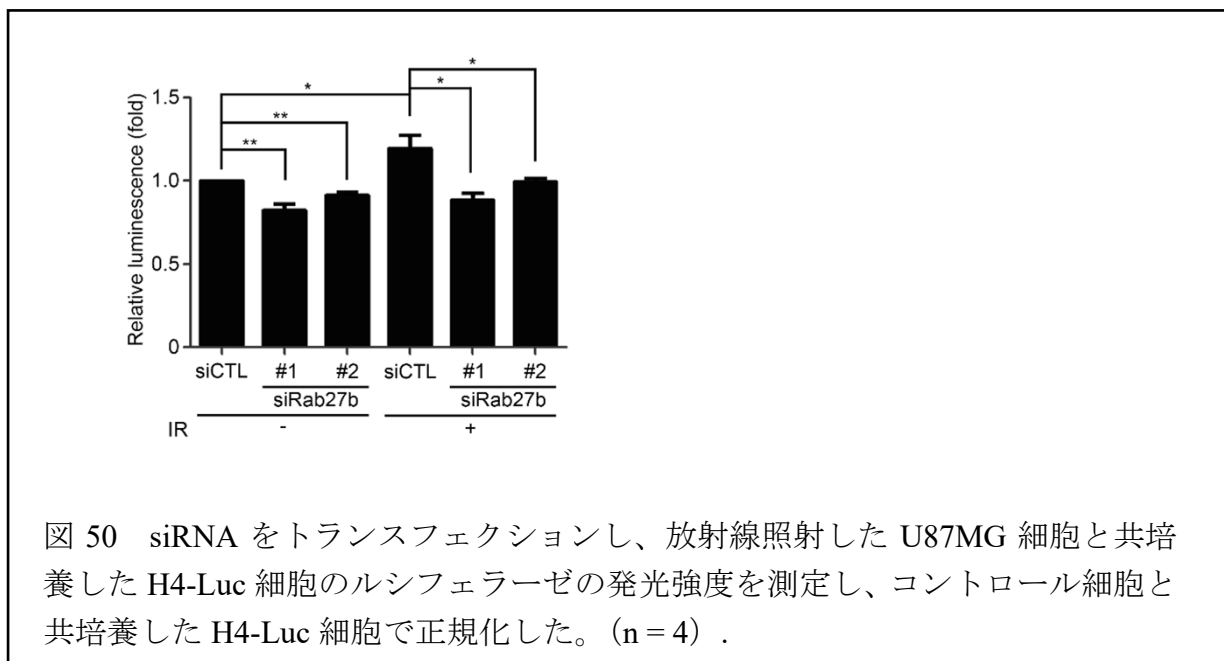
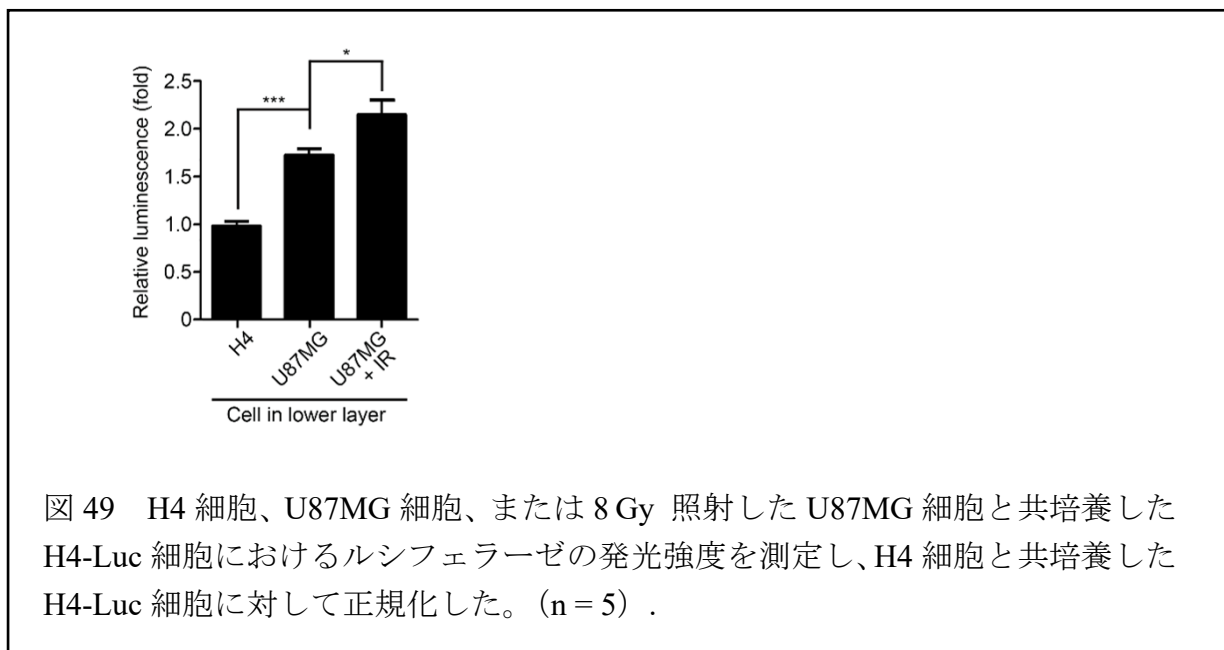
一方、Rab27b ノックダウン細胞との共培養では、放射線照射後の U87MG による H4 細胞の増殖亢進は、コントロールの U87MG 細胞との共培養に比べて抑制された (図 47)。



3D 共培養では、H4 または U87MG 細胞を lrECM でサンドイッチし、Red-Fluc をトランスフェクションした H4 細胞 (H4-Luc) 細胞と共培養した後、Luciferase による発光強度を測定することで H4 の増殖を評価した (図 48)。



3D 共培養システムでも 2D 共培養システムと同様の結果が得られた(図 49、50)。



以上のことから、放射線治療後、Rab27b-EREG 経路がパラクライン効果を発揮して他サブタイプの細胞の増殖を促進することが示唆された。

考 察

放射線治療は、手術や化学療法と組み合わせて行われるが、治療抵抗性や腫瘍の再発などにより、膠芽腫患者の予後は依然として不良である (Ostrom et al., 2018; Stupp et al., 2009)。複数の Rab について、発現亢進はがん細胞の生存や増殖、浸潤を促進することが知られており (Gopal Krishnan et al., 2020; Thomas et al., 2014; Yang et al., 2015)、Rab27 の発現亢進も膠芽腫を含めた複数のがん種において腫瘍進展や予後との相関が示唆されている (Bobrie et al., 2012; Dornier et al., 2017; Feng et al., 2016; Li et al., 2017; Wang et al., 2015, 2008; Wu et al., 2013)。Rab27 は小胞やタンパク質の輸送を制御することで細胞間コミュニケーションを担い (Ostrowski et al., 2010)、ある種の細胞間コミュニケーションは放射線抵抗性に寄与することが示唆されている (Kang et al., 2016; Ni et al., 2019; Yue et al., 2019)。本研究は、放射線によって誘発される Rab27b-EREG シグナルの増加が、膠芽腫細胞の放射線抵抗性に寄与することや、パラクライン的に周辺細胞の増殖を促進することを示している。

先行研究から、細胞内の小胞輸送が放射線抵抗性に寄与する可能性が示唆されていた (data not shown)。そのため、小胞輸送の制御因子である Rab ファミリーに着目し、X 線を照射した膠芽腫細胞株 U87MG における Rab の転写レベルを網羅的に解析した。本研究では、Rab ファミリーの中で最も発現が上昇していた Rab27b に注目した (図 7)。放射線照射後に Rab27b のタンパク質発現が増加し、その傾向は少なくとも 7 日間持続したことから (図 12)、細胞計数アッセイ、コロニー形成アッセイ、パラクラインアッセイ、*in vivo* 実験などの複数のエンドポイントにおいても Rab27b の発現が増加していたと考えられる。Rab27b を抑制すると、*in vitro* では X 線照射後における膠芽腫細胞の生存率が低下し (図 17)、*in vivo* モデルでは放射線処理後における腫瘍の成長を遅らせ、マウスの生存期間を延長した (図 22、23)。我々の結果とは対照的に、Huang らは、Rab27b の抑制が放射線治療後の上咽頭がん細胞の生存率を高めることを報告した (Huang et al., 2017)。Huang らと我々の結果の違いは、放射線応答における Rab27b の役割が、がんの種類によって異なる可能性を示唆している。

これまでにも、いくつかの Rab タンパク質が放射線抵抗性に関与することが報告されている。Rab12 の発現は X 線照射後の Human papillomavirus ポジティブの子宮頸がんにおいて亢進しており、G2/M Arrest を増加させることで放射線抵抗性を促進することが示された (Huang et al., 2021)。Rab25 の発現は X 線照射後

の肺がんおよび上咽頭がんにおいて亢進しており、EGFR リサイクリングを促すことによりそのパスウェイを活性化し、増殖を亢進させることが明らかにされた (Zhang et al., 2020)。本研究において、様々な Rab の発現が X 線照射後に増加または減少していた (図 7)。Rab27b 以外の Rab も放射線抵抗性に関与する可能性がある。様々な Rab の X 線照射後の膠芽腫細胞における機能や、増減するメカニズムを解明することは、膠芽腫の放射線抵抗性メカニズムの理解をさらに深めるだろう。

腫瘍の進行には、腫瘍細胞の増殖に加えて、浸潤や腫瘍微小環境との相互作用が重要である (Krakhmal et al., 2015; Quail and Joyce, 2017)。Rab27b は、分泌因子の制御により腫瘍の浸潤や成長を促進することが報告されている (Hendrix et al., 2010; Li et al., 2017; Wang et al., 2015)。我々が行った *in vivo* の実験では、Rab27b のノックダウンにより、放射線治療後のマウスにおける脳腫瘍の成長が遅延した (図 22)。これらのことから、Rab27b は、放射線照射後の膠芽腫細胞の浸潤や周辺組織との相互作用、細胞増殖にも重要な役割を果たしている可能性がある。今後、放射線抵抗性や照射後の腫瘍増殖、浸潤における Rab27b の役割やその分子メカニズムをさらに詳しく調べる必要がある。

Rab27a と Rab27b は、71%のアミノ酸相同性を有している (Ramalho et al., 2001)。Rab27a と Rab27b はともに、骨芽細胞における Nuclear factor kappa B (NF- κ B) リガンドの受容体活性化因子である Receptor activator of NF- κ B ligand の放出を媒介する (Kariya et al., 2011)。また、ともにメラノサイトのメラノソームに結合していることから、これら 2 つのタンパク質は機能的に相同性があると考えられている (Ramalho et al., 2001)。一方、Rab27a は様々な組織で発現しているが、Rab27b は一部の組織で発現が確認されている (Barral et al., 2002)。また、下垂体細胞において Rab27a と Rab27b は異なる発現を示し、異なるペプチドホルモンの分泌に影響を与えている (Zhao et al., 2002)。さらに、HeLa 細胞では、Rab27a と Rab27b はエクソソームの分泌過程の異なるステップを制御している (Ostrowski et al., 2010)。これらのことから、両者は異なる機能を持つと考えられている。本研究では、グリオーマ細胞株によって Rab27a と Rab27b の発現パターンが異なっていた (図 28)。また X 線照射した膠芽腫細胞では、Rab27b が特異的に増加したが、Rab27a の発現は増加しなかった (図 9、10)。このように、膠芽腫細胞では放射線照射に応じて Rab27a と Rab27b を制御するメカニズムが異なる可能性がある。膠芽腫や様々な種類のがん細胞における Rab27b とそのアイソフォームである Rab27a の関係を含め、Rab27 が関与する放射線抵抗性のメカニズムを解明するには、さらなる研究が必要である。

がん細胞は、成長因子、サイトカイン、プロテアーゼ、エクソソームなどの分泌因子を放出することで、腫瘍微小環境を調節し、生存と進行を促進している (Bian et al., 2019; Yuan et al., 2016)。過去の研究では、**EREG** が隣接する細胞の増殖を刺激し、パラクラインメカニズムを介して腫瘍の進行に寄与することが示されている。腫瘍関連マクロファージと乳がん細胞は、**EREG** を含む分泌因子を介してパラクライン相互作用を示す (Vlaicu et al., 2013)。また、腸管線維芽細胞由来の **EREG** の分泌は、隣接する腸管上皮細胞の増殖や腫瘍細胞への分化転換を促進する (Neufert et al., 2013)。**EREG** はパラクライン作用に加えて、**U87MG** 細胞の **EGFR** を介したオートクライン成長を促進し、この作用がグリオーマの進行に寄与していると報告された (Auf et al., 2013)。我々の知る限り、本研究は、**EREG** の発現が X 線によって上昇し、がんの放射線抵抗性に関与していることを示した初めての研究である。我々の結果は、**Rab27b** ノックダウンによる放射線抵抗性の低下が **EREG** ノックダウンによるものよりも高いことを示している (図 17、35)。**Rab27b** は **EREG** だけでなく、エクソソームや **Heat shock protein 90 α** 、**MMP-9** などの分泌を制御している (Ostrowski et al., 2010; Wang et al., 2015; Yang et al., 2019)。このことから、**Rab27b** の増加を介した放射線抵抗性における **EREG** の寄与は部分的であり、他の因子も放射線照射後に発現や分泌が亢進することで、**Rab27b** の増加を介して放射線抵抗性を媒介している可能性が考えられる。放射線抵抗性における **Rab27b** の役割を解明するには、**Rab27b** の亢進により上昇する分泌因子をより詳細に理解する必要がある。

EREG は、グリコシル化された **Proepiregulin** タンパク質として合成され、プロセシングされて C 末端のプロペプチドと成熟型 **EREG** が生成される (Baba et al., 2000)。興味深いことに、**EREG** は、2D 培養と 3D 培養で異なるタンパク質バンドパターンを示している (図 28)。特に、約 12 kDa と 22 kDa の 2 つのタンパク質バンドのレベルは、2D 培養した細胞よりも 3D 培養した細胞の方が高かった。12 kDa のバンドは、C 末端の **EREG** プロペプチドに相当する。**Proepiregulin** のプロセシングは、**A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 17** によって媒介される (Sahin et al., 2004)。したがって、2D と 3D の条件下で培養された細胞では **ADAM17** の活性が異なり、その結果、C 末端の **EREG** プロペプチドのレベルが異なる可能性がある。22 kDa のバンドは、グリコシル化された **Proepiregulin** に相当する。タンパク質のグリコシル化は、細胞の環境に影響を受ける (Nam et al., 2008)。2D と 3D では細胞の培養環境が大きく異なるため、**EREG** のグリコシル化は細胞培養条件の影響を受けている可能性がある。

本研究の結果は、放射線治療後に亢進した Rab27b が EREG の発現と分泌を増加させ、増加した EREG が Rab27b の発現亢進にも影響を与えることを示唆している。Rab27b と EREG の発現がフィードバックループとして相互に制御されていることを示しているが、そのメカニズムは解明されていない。IL-6 や IL-17 などのいくつかのサイトカインは EREG の発現を増加させ、NF- κ B、Signal transducer and activator of transcription 3、Mitogen-activated protein kinase カスケードなどの細胞内シグナルカスケードを活性化することが報告されている (Harada et al., 2015; Murakami et al., 2013)。さらに、EREG に加えて、他の分泌タンパク質も膠芽腫における放射線照射後の EREG-Rab27b フィードバックループに関与している可能性もある。放射線照射によって Rab27b と EREG が上昇し、さらに相互に制御するメカニズムを理解するには、さらなる解析が必要である。

膠芽腫は、異なる表現型と増殖能、を持つ細胞サブタイプで構成されている (Soeda et al., 2015)。腫瘍内の不均一性は、膠芽腫の治療抵抗性に寄与すると考えられている (Qazi et al., 2017)。最近の研究では、IL-4 と Insulin like growth factor 1 の放出を媒介とする多細胞パラクラインフィードバックループがアストロサイトの分化転換を活性化し、髄芽腫の腫瘍成長に不可欠であることが示された (Yao et al., 2020)。本研究では、悪性度の高い U87MG 細胞と共培養させることで、悪性度の低い H4 細胞の増殖が促進された (図 46、49)。このパラクライン効果は、U87MG 細胞に放射線照射することで増強され、Rab27b を抑制することで減少した (図 47、50)。これらの結果は、Rab27b が放射線治療後に EREG 分泌を介して腫瘍内の他の亜集団の細胞の増殖を促進することで、膠芽腫の成長および放射線抵抗性に寄与している可能性を示唆している。放射線照射後の Rab27b-EREG 経路を介した分泌因子の放出は、膠芽腫微小環境における他タイプのがん細胞の増殖や、サブタイプの変化、分化転換に影響を与える可能性がある。

TCGA データの解析において、Rab27a または Rab27b 単独では患者の生存期間と有意差がないが、Rab27a と Rab27b の発現が両方とも高い群で患者の生存期間が有意に短く、EREG の発現もより高かった (図 25、26)。神経膠腫細胞株の比較においても、Rab27a と Rab27b の発現が両方とも高い細胞株において EREG の発現も高い傾向が観察された (図 28) これらのことから、Rab27a と Rab27b の発現が両方とも高いことが、膠芽腫の悪性化や治療後の増殖スピードにおいて重要であり、Rab27a または Rab27b のどちらかを抑制することで患者の予後が改善される可能性がある。

我々の実験結果は、Rab27b の抑制が膠芽腫細胞の放射線感受性を増加させることを示唆している。Rab27b を標的とした薬剤を臨床に導入するためには、主に3つのステップが必要である。第一に、Rab27b とそのエフェクターとの相互作用を阻害する阻害剤を設計する必要がある。Rab27b のホモログである Rab27a の阻害剤はすでに開発されており、市販されている。Rab27a の阻害剤である Nexinhib20 は、Rab27a のエフェクターである Synaptotagmin-like protein 1 への Rab27a の結合を阻害する (Johnson et al., 2016)。Rab27b の阻害剤も Rab27a の阻害剤と同様の戦略で開発される可能性がある。第二に、血液脳関門を克服して Rab27b 阻害剤を腫瘍領域に輸送するデリバリーシステムが必要である。最近では、ナノ粒子やエクソソームなど、血液脳関門を通過して薬剤を送達するための戦略がいくつか研究されている (Dong, 2018)。これらの研究分野が発展すれば、治療薬を脳内に送達するという課題を克服する可能性がある。最後に、Rab27b を抑制することによる副作用を確認および軽減させることが必要である。膠芽腫において Rab27b は亢進している場合が多いが、アストロサイトなどの脳内の正常細胞にも Rab27b が発現しており、分泌因子の輸送制御などの機能を持つと考えられる (Shen et al., 2016; Zhang et al., 2015)。欠失が遺伝病を引き起こす Rab27a とは異なり、Rab27b の欠失による疾患は報告されていないため (Gomi et al., 2007; Van Gele et al., 2009)、副作用は Rab27a の抑制に比べると軽微であることが予想されるが、Rab27b の抑制による生体への副作用の確認は必要であると考えられる。このように、臨床治療につなげるためには、多面的な研究が必要である。

結論として、本研究は Rab27b と EREG は侵攻性の高い脳腫瘍細胞で共発現しており、放射線照射後にその発現がさらに増加し、膠芽腫の放射線抵抗性に寄与することを明らかにした。さらに、Rab27b は放射線治療に応答して EREG を制御し、EREG は隣接する細胞と相互作用して腫瘍の進行を促進することがわかった。したがって、Rab27b-EREG 経路を標的とすることで、膠芽腫の放射線治療の効果を向上させることができるかもしれない。

総括および結論

本研究から得られた新知見

- 放射線照射後の U87MG 細胞において、Rab ファミリーのうち特に Rab27b が増加する。
- Rab27b の抑制が膠芽腫細胞の放射線に対する感受性を高める。
- EREG の発現は Rab27 の発現と相関している。
- 膠芽腫細胞において Rab27b と EREG は互いにフィードバック制御を受ける。
- EREG は放射線照射後に亢進し、放射線抵抗性に寄与する。
- 放射線照射後に亢進した Rab27b-EREG がパラクライン的に作用し、近接細胞における EGFR のリン酸化や増殖を促進する。

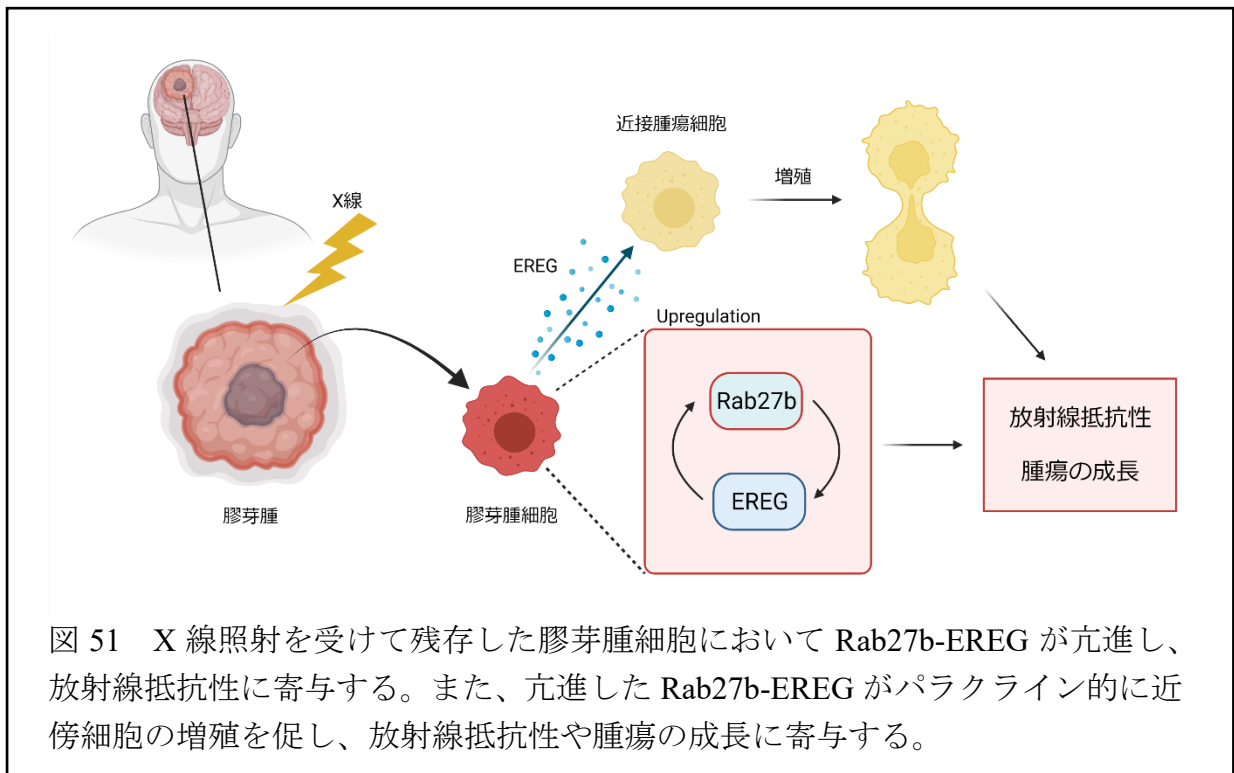


図 51 X 線照射を受けて残存した膠芽腫細胞において Rab27b-EREG が亢進し、放射線抵抗性に寄与する。また、亢進した Rab27b-EREG がパラクライン的に近傍細胞の増殖を促し、放射線抵抗性や腫瘍の成長に寄与する。

新知見の意義

本研究は Rab27b と EREG は悪性度の高い脳腫瘍細胞で共発現しており、放射線照射後にその発現がさらに増加し、膠芽腫の放射線抵抗性に寄与することを明らかにした。さらに、Rab27b は放射線治療に応答して EREG を制御し、EREG は隣接する細胞と相互作用して腫瘍の進行を促進することを見出した。これらの新知見は、これまで報告されていなかった Rab27 や EREG の新たな役割を提示し、Rab27b-EREG 経路を標的とすることで膠芽腫の放射線治療の効果を向上させる可能性を示す。

今後の課題および期待される研究の展開

- マイクロアレイ解析によると、X 線照射によって発現が上昇した Rab は Rab27b 以外にも複数存在する。逆に、減少した Rab もある。これらの Rab が X 線照射後の膠芽腫細胞において果たす機能や、増減するメカニズムを解明することは、膠芽腫の放射線抵抗性メカニズムの理解をさらに深めるだろう。
- Rab27a と Rab27b はともに細胞外への小胞輸送を制御することが報告されているタンパク質であり、アミノ酸の相同性は 71% である。本研究では、Rab27a と Rab27b が膠芽腫細胞において異なる機能を持つことが示唆された。Rab27a と Rab27b の機能における詳細な差異や、その差異を生む原因を解明することは、Rab の働きについての理解を深めるだろう。
- Rab27b と EREG の共制御における詳細なメカニズムは解明されていない。これを明らかにすることで、膠芽腫における X 線照射の応答のメカニズムをさらに詳しく理解することができると考えられる。
- 本研究では、Rab27b の制御を受ける分子として EREG に着目したが、他にも Rab27b の制御を受ける分泌因子が存在すると考える。Rab27b の制御を受ける分子を解明することは、放射線照射後に亢進する Rab27b の役割や、Rab27b が放射線抵抗性を生むメカニズムをさらに詳しく理解することにつながる。
- 本研究で得られた新知見を応用し、Rab27b-EREG 経路を標的として膠芽腫の放射線感受性を上昇させる治療を行うためには、克服すべき課題が複数存在する。すなわち、Rab27b-EREG 経路の阻害剤の開発、その阻害剤を標的腫瘍細胞に到達させるための輸送システム、Rab27b-EREG 経路を阻害することによる副作用の検証をする必要がある。このように、臨床応用のためにはさらなる多面的な研究が必要とされる。

謝 辞

本論文の作成にあたり、丁寧な指導や助言をくださった小野寺康人准教授に感謝します。研究のみならず、研究室の維持・管理や筆者の進路についても熱心に指導や助言をくださった南叡叅准教授には、感謝の念にたえません。吳秉修助教授には、研究への助言や実験指導をしていただきました。本当にありがとうございました。

南叡叅准教授、小野寺康人准教授をはじめ、白土博樹教授、清水伸一教授の支えなくしては私の研究生活がより厳しいものになっていたと思います。ご協力くださった皆様に心より感謝申し上げます。

本論文の実験において、アポトーシスアッセイや *in vivo* 実験に吳秉修助教授、パラクラインアッセイやマイクロアレイ、タンパク質発現解析などに南叡叅准教授、TCGA 解析に小野寺康人准教授のご助力を得ました。感謝の意を表します。また、他にも本研究にご助力くださった共著者の皆様に感謝します。実験補助員の佐々木規子さんや菅野恵子さん、同期の Opadele Abayomi emmanuel、堀川まりさん、岸真智子さん、津花祥さんなど事務員や秘書の方々にも大変お世話になりました。皆様ありがとうございました。

本論文における一部の図の作成には、**BioRender** を使用しました。

引用文献

Alexander, M., Ramstead, A.G., Bauer, K.M., Lee, S.-H., Runtsch, M.C., Wallace, J., Huffaker, T.B., Larsen, D.K., Tolmachova, T., Seabra, M.C., et al. (2017). Rab27-dependent exosome production inhibits chronic inflammation and enables acute responses to inflammatory stimuli. *J. Immunol.* *199*, 3559–3570.

Almiron Bonnin, D.A., Havrda, M.C., and Israel, M.A. (2018). Glioma cell secretion: a driver of tumor progression and a potential therapeutic target. *Cancer Res.* *78*, 6031–6039.

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R.S., Allison, A.C., and Rak, J. (2009). Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3794–3799.

Aravindan, N., Aravindan, S., Pandian, V., Khan, F.H., Ramraj, S.K., Natt, P., and Natarajan, M. (2014). Acquired tumor cell radiation resistance at the treatment site is mediated through radiation-orchestrated intercellular communication. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *88*, 677–685.

Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guérit, S., Pineau, R., North, S., Platonova, N., Maitre, M., Favereaux, A., Vajkoczy, P., et al. (2013). High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer* *13*, 597.

Baba, I., Shirasawa, S., Iwamoto, R., Okumura, K., Tsunoda, T., Nishioka, M., Fukuyama, K., Yamamoto, K., Mekada, E., and Sasazuki, T. (2000). Involvement of deregulated Epiregulin expression in tumorigenesis in vivo through activated Ki-Ras signaling pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res.* *60*, 6886–6889.

Barr, F., and Lambright, D.G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 461–470.

Barral, D.C., Ramalho, J.S., Anders, R., Hume, A.N., Knapton, H.J., Tolmachova, T., Collinson, L.M., Goulding, D., Authi, K.S., and Seabra, M.C. (2002). Functional

redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome. *J. Clin. Invest.* *110*, 247–257.

Bian, X., Xiao, Y.-T., Wu, T., Yao, M., Du, L., Ren, S., and Wang, J. (2019). Microvesicles and chemokines in tumor microenvironment: mediators of intercellular communications in tumor progression. *Mol. Cancer* *18*, 50.

Bindra, R.S., Chalmers, A.J., Evans, S., and Dewhirst, M. (2017). GBM radiosensitizers: dead in the water...or just the beginning? *J. Neurooncol.* *134*, 513–521.

Bobrie, A., Krumeich, S., Reyal, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M., and Théry, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res.* *72*, 4920–4930.

Brat, D.J., Bellail, A.C., and Van Meir, E.G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro. Oncol.* *7*, 122–133.

Chang, J.E., Khuntia, D., Robins, H.I., and Mehta, M.P. (2007). Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* *5*, 894–902, 907–915.

Chen, L., Chaichana, K.L., Kleinberg, L., Ye, X., Quinones-Hinojosa, A., and Redmond, K. (2015). Glioblastoma recurrence patterns near neural stem cell regions. *Radiother. Oncol.* *116*, 294–300.

Chen, L., Lin, G., Chen, K., Wan, F., Liang, R., Sun, Y., Chen, X., and Zhu, X. (2020). VEGF knockdown enhances radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma by inhibiting autophagy through the activation of mTOR pathway. *Sci. Rep.* *10*, 1–14.

Chen, X., Li, C., Izumi, T., Ernst, S.A., Andrews, P.C., and Williams, J.A. (2004). Rab27b localizes to zymogen granules and regulates pancreatic acinar exocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *323*, 1157–1162.

Chen, Y., Guo, X., Deng, F.-M., Liang, F.-X., Sun, W., Ren, M., Izumi, T., Sabatini, D.D., Sun, T.-T., and Kreibich, G. (2003). Rab27b is associated with fusiform vesicles and may be involved in targeting uroplakins to urothelial apical membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 14012–14017.

- Diekmann, Y., Seixas, E., Gouw, M., Tavares-Cadete, F., Seabra, M.C., and Pereira-Leal, J.B. (2011). Thousands of rab GTPases for the cell biologist. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002217.
- Dong, X. (2018). Current strategies for brain drug delivery. *Theranostics* 8, 1481–1493.
- Dornier, E., Rabas, N., Mitchell, L., Novo, D., Dhayade, S., Marco, S., Mackay, G., Sumpton, D., Pallares, M., Nixon, C., et al. (2017). Glutaminolysis drives membrane trafficking to promote invasiveness of breast cancer cells. *Nat. Commun.* 8, 2255.
- Feng, F., Jiang, Y., Lu, H., Lu, X., Wang, S., Wang, L., Wei, M., Lu, W., Du, Z., Ye, Z., et al. (2016). Rab27A mediated by NF- κ B promotes the stemness of colon cancer cells via up-regulation of cytokine secretion. *Oncotarget* 7, 63342–63351.
- Fidoamore, A., Cristiano, L., Antonosante, A., d'Angelo, M., Di Giacomo, E., Astarita, C., Giordano, A., Ippoliti, R., Benedetti, E., and Cimini, A. (2016). Glioblastoma stem cells microenvironment: the paracrine roles of the niche in drug and radioresistance. *Stem Cells Int.* 2016, 6809105.
- Fukuda, M. (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2801–2813.
- Fukuda, M. (2013). Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic* 14, 949–963.
- Gomi, H., Mori, K., Itohara, S., and Izumi, T. (2007). Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the delivery of secretory granules near the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 18, 4377–4386.
- Gopal Krishnan, P.D., Golden, E., Woodward, E.A., Pavlos, N.J., and Blancafort, P. (2020). Rab GTPases: Emerging oncogenes and tumor suppressive regulators for the editing of survival pathways in cancer. *Cancers* 12.
- Green, M.M.L., Hiley, C.T., Shanks, J.H., Bottomley, I.C., West, C.M.L., Cowan, R.A., and Stratford, I.J. (2007). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in locally invasive prostate cancer is prognostic for radiotherapy outcome. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 67, 84–90.
- Gupta, T., Nair, V., Paul, S.N., Kannan, S., Moiyadi, A., Epari, S., and Jalali, R. (2012).

Can irradiation of potential cancer stem-cell niche in the subventricular zone influence survival in patients with newly diagnosed glioblastoma? *J. Neurooncol.* *109*, 195–203.

Harada, M., Kamimura, D., Arima, Y., Kohsaka, H., Nakatsuji, Y., Nishida, M., Atsumi, T., Meng, J., Bando, H., Singh, R., et al. (2015). Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *J. Immunol.* *194*, 1039–1046.

Harpain, F., Ahmed, M.A., Hudec, X., Timelthaler, G., Jomrich, G., Müllauer, L., Selzer, E., Dörr, W., Bergmann, M., Holzmann, K., et al. (2019). FGF8 induces therapy resistance in neoadjuvantly radiated rectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *145*, 77–86.

Henderson, M.C., and Azorsa, D.O. (2012). The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. *Front. Oncol.* *2*, 38.

Hendrix, A., Maynard, D., Pauwels, P., Braems, G., Denys, H., Van den Broecke, R., Lambert, J., Van Belle, S., Cocquyt, V., Gespach, C., et al. (2010). Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* *102*, 866–880.

Huang, D., Bian, G., Pan, Y., Han, X., Sun, Y., Wang, Y., Shen, G., Cheng, M., Fang, X., and Hu, S. (2017). MiR-20a-5p promotes radio-resistance by targeting Rab27B in nasopharyngeal cancer cells. *Cancer Cell Int.* *17*, 32.

Huang, Y., Tian, Y., Zhang, W., Liu, R., and Zhang, W. (2021). Rab12 promotes radioresistance of HPV-positive cervical cancer cells by Increasing G2/M arrest. *Front. Oncol.* *11*, 586771.

Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* *91*, 119–149.

Jabbari, N., Nawaz, M., and Rezaie, J. (2019). Ionizing radiation increases the activity of exosomal secretory pathway in MCF-7 human breast cancer cells: a possible way to communicate resistance against radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.

Johnson, J.L., Brzezinska, A.A., Tolmachova, T., Munafo, D.B., Ellis, B.A., Seabra, M.C., Hong, H., and Catz, S.D. (2010). Rab27a and Rab27b regulate neutrophil azurophilic granule exocytosis and NADPH oxidase activity by independent mechanisms. *Traffic* *11*, 533–547.

- Johnson, J.L., Ramadass, M., He, J., Brown, S.J., Zhang, J., Abgaryan, L., Biris, N., Gavathiotis, E., Rosen, H., and Catz, S.D. (2016). Identification of Nexinhibs, small-molecule inhibitors of neutrophil exocytosis and inflammation. Druggability of the small GTPase Rab27a. *J. Biol. Chem.* *291*, 25965–25982.
- Kang, J., Kim, W., Kwon, T., Youn, H., Kim, J.S., and Youn, B. (2016). Plasminogen activator inhibitor-1 enhances radioresistance and aggressiveness of non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* *7*, 23961–23974.
- Kariya, Y., Honma, M., Hanamura, A., Aoki, S., Ninomiya, T., Nakamichi, Y., Udagawa, N., and Suzuki, H. (2011). Rab27a and Rab27b are involved in stimulation-dependent RANKL release from secretory lysosomes in osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* *26*, 689–703.
- Kil, W.J., Tofilon, P.J., and Camphausen, K. (2012). Post-radiation increase in VEGF enhances glioma cell motility in vitro. *Radiat. Oncol.* *7*, 25.
- Kohsaka, S., Hinohara, K., Wang, L., Nishimura, T., Urushido, M., Yachi, K., Tsuda, M., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara, H., et al. (2014). Epiregulin enhances tumorigenicity by activating the ERK/MAPK pathway in glioblastoma. *Neuro. Oncol.* *16*, 960–970.
- Krakhmal, N.V., Zavyalova, M.V., Denisov, E.V., Vtorushin, S.V., and Perelmuter, V.M. (2015). Cancer invasion: patterns and mechanisms. *Acta Naturae* *7*, 17–28.
- Kramp, T.R., and Camphausen, K. (2012). Combination radiotherapy in an orthotopic mouse brain tumor model. *J. Vis. Exp.* e3397.
- Lee, G.Y., Kenny, P.A., Lee, E.H., and Bissell, M.J. (2007). Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat. Methods* *4*, 359–365.
- Li, J., Jin, Q., Huang, F., Tang, Z., and Huang, J. (2017). Effects of Rab27A and Rab27B on invasion, proliferation, apoptosis, and chemoresistance in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* *46*, 1173–1179.
- Maacha, S., Bhat, A.A., Jimenez, L., Raza, A., Haris, M., Uddin, S., and Grivel, J.-C. (2019). Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Mol. Cancer* *18*, 55.
- Maksym, R.B., Tarnowski, M., Grymula, K., Tarnowska, J., Wysoczynski, M., Liu, R.,

- Czerny, B., Ratajczak, J., Kucia, M., and Ratajczak, M.Z. (2009). The role of stromal-derived factor-1-CXCR7 axis in development and cancer. *Eur. J. Pharmacol.* *625*, 31–40.
- McIntyre, G.J., and Fanning, G.C. (2006). Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC Biotechnol.* *6*, 1.
- Mrowczynski, O.D., Madhankumar, A.B., Sundstrom, J.M., Zhao, Y., Kawasawa, Y.I., Slagle-Webb, B., Mau, C., Payne, R.A., Rizk, E.B., Zacharia, B.E., et al. (2018). Exosomes impact survival to radiation exposure in cell line models of nervous system cancer. *Oncotarget* *9*, 36083–36101.
- Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J.-J., Atsumi, T., et al. (2013). Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep.* *3*, 946–959.
- Nam, J.H., Zhang, F., Ermonval, M., Linhardt, R.J., and Sharfstein, S.T. (2008). The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* *100*, 1178–1192.
- Nam, J.-M., Onodera, Y., Bissell, M.J., and Park, C.C. (2010). Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin. *Cancer Res.* *70*, 5238–5248.
- Nam, J.-M., Ahmed, K.M., Costes, S., Zhang, H., Onodera, Y., Olshen, A.B., Hatanaka, K.C., Kinoshita, R., Ishikawa, M., Sabe, H., et al. (2013). β 1-integrin via NF- κ B signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. *Breast Cancer Res.* *15*, R60.
- Neufert, C., Becker, C., Türeci, Ö., Waldner, M.J., Backert, I., Floh, K., Atreya, I., Leppkes, M., Jefremow, A., Vieth, M., et al. (2013). Tumor fibroblast-derived epiregulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK. *J. Clin. Invest.* *123*, 1428–1443.
- Ni, J., Bucci, J., Malouf, D., Knox, M., Graham, P., and Li, Y. (2019). Exosomes in cancer radioresistance. *Front. Oncol.* *9*, 869.
- Onodera, Y., Nam, J.-M., Horikawa, M., Shirato, H., and Sabe, H. (2018). Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde

trafficking to avoid oxidative catastrophe. *Nat. Commun.* *9*, 2682.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2018). CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro. Oncol.* *20*, iv1–iv86.

Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* *12*, 19–30; sup pp 1-13.

Ou, A., Yung, W.K.A., and Majd, N. (2020). Molecular mechanisms of treatment resistance in glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* *22*.

Pereira-Leal, J.B., and Seabra, M.C. (2000). The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* *301*, 1077–1087.

Pfeffer, S.R. (2017). Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* *28*, 712–715.

Qazi, M.A., Vora, P., Venugopal, C., Sidhu, S.S., Moffat, J., Swanton, C., and Singh, S.K. (2017). Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann. Oncol.* *28*, 1448–1456.

Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2017). The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell* *31*, 326–341.

Ramalho, J.S., Tolmachova, T., Hume, A.N., McGuigan, A., Gregory-Evans, C.Y., Huxley, C., and Seabra, M.C. (2001). Chromosomal mapping, gene structure and characterization of the human and murine RAB27B gene. *BMC Genet.* *2*, 2.

Ren, P., Yang, X.-Q., Zhai, X.-L., Zhang, Y.-Q., and Huang, J.-F. (2016). Overexpression of Rab27B is correlated with distant metastasis and poor prognosis in ovarian cancer. *Oncol. Lett.* *12*, 1539–1545.

Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* *164*, 769–779.

Segev, N. (2001). Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci. STKE* *2001*, re11.

Shen, Y.-T., Gu, Y., Su, W.-F., Zhong, J.-F., Jin, Z.-H., Gu, X.-S., and Chen, G. (2016). Rab27b is involved in lysosomal exocytosis and proteolipid protein trafficking in oligodendrocytes. *Neurosci. Bull.* 32, 331–340.

Singh, R.K., Mizuno, K., Wasmeier, C., Wavre-Shapton, S.T., Recchi, C., Catz, S.D., Futter, C., Tolmachova, T., Hume, A.N., and Seabra, M.C. (2013). Distinct and opposing roles for Rab27a/Mlph/MyoVa and Rab27b/Munc13-4 in mast cell secretion. *FEBS J.* 280, 892–903.

Soeda, A., Hara, A., Kunisada, T., Yoshimura, S.-I., Iwama, T., and Park, D.M. (2015). The evidence of glioblastoma heterogeneity. *Sci. Rep.* 5, 7979.

Son, B., Lee, S., Youn, H., Kim, E., Kim, W., and Youn, B. (2017). The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. *Oncotarget* 8, 3933–3945.

Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S.G.M., Touloumis, A., Collins, V.P., Marioni, J.C., Curtis, C., Watts, C., and Tavaré, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4009–4014.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466.

Sun, L., Hui, A.-M., Su, Q., Vortmeyer, A., Kotliarov, Y., Pastorino, S., Passaniti, A., Menon, J., Walling, J., Bailey, R., et al. (2006). Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell* 9, 287–300.

Takahashi, M., Hayashi, K., Yoshida, K., Ohkawa, Y., Komurasaki, T., Kitabatake, A., Ogawa, A., Nishida, W., Yano, M., Monden, M., et al. (2003). Epiregulin as a major autocrine/paracrine factor released from ERK- and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells. *Circulation* 108, 2524–2529.

Tan, A.C., Ashley, D.M., López, G.Y., Malinzak, M., Friedman, H.S., and Khasraw, M.

- (2020). Management of glioblastoma: state of the art and future directions. *CA Cancer J. Clin.* *70*, 299–312.
- Thomas, J.D., Zhang, Y.-J., Wei, Y.-H., Cho, J.-H., Morris, L.E., Wang, H.-Y., and Zheng, X.F.S. (2014). Rab1A is an mTORC1 activator and a colorectal oncogene. *Cancer Cell* *26*, 754–769.
- Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., and Xiao, Z. (2010). Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J. Cell. Biochem.* *111*, 488–496.
- Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., Huxley, C., and Seabra, M.C. (2004). A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol. Biol. Cell* *15*, 332–344.
- Tsuruda, M., Yoshino, H., Okamura, S., Kuroshima, K., Osako, Y., Sakaguchi, T., Sugita, S., Tatarano, S., Nakagawa, M., and Enokida, H. (2020). Oncogenic effects of RAB27B through exosome independent function in renal cell carcinoma including sunitinib-resistant. *PLoS One* *15*, e0232545.
- Van Gele, M., Dynoodt, P., and Lambert, J. (2009). Griscelli syndrome: a model system to study vesicular trafficking. *Pigment Cell Melanoma Res.* *22*, 268–282.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* *184*, 39–51.
- Vilalta, M., Rafat, M., Giaccia, A.J., and Graves, E.E. (2014). Recruitment of circulating breast cancer cells is stimulated by radiotherapy. *Cell Rep.* *8*, 402–409.
- Vlaicu, P., Mertins, P., Mayr, T., Widschwendter, P., Ataseven, B., Högel, B., Eiermann, W., Knyazev, P., and Ullrich, A. (2013). Monocytes/macrophages support mammary tumor invasivity by co-secreting lineage-specific EGFR ligands and a STAT3 activator. *BMC Cancer* *13*, 197.
- Wang, H., Wang, Y., Bao, Z., Zhang, C., Liu, Y., Cai, J., and Jiang, C. (2015). Hypomethylated Rab27b is a progression-associated prognostic biomarker of glioma regulating MMP-9 to promote invasion. *Oncol. Rep.* *34*, 1503–1509.

- Wang, J.-S., Wang, F.-B., Zhang, Q.-G., Shen, Z.-Z., and Shao, Z.-M. (2008). Enhanced expression of Rab27A gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-II. *Mol. Cancer Res.* 6, 372–382.
- Wheeler, D.B., Zoncu, R., Root, D.E., Sabatini, D.M., and Sawyers, C.L. (2015). Identification of an oncogenic RAB protein. *Science* 350, 211–217.
- Wilson, K.J., Mill, C., Lambert, S., Buchman, J., Wilson, T.R., Hernandez-Gordillo, V., Gallo, R.M., Ades, L.M.C., Settleman, J., and Riese, D.J., 2nd (2012). EGFR ligands exhibit functional differences in models of paracrine and autocrine signaling. *Growth Factors* 30, 107–116.
- Wu, X., Hu, A., Zhang, M., and Chen, Z. (2013). Effects of Rab27a on proliferation, invasion, and anti-apoptosis in human glioma cell. *Tumour Biol.* 34, 2195–2203.
- Yang, J., Liu, W., Lu, X., Fu, Y., Li, L., and Luo, Y. (2015). High expression of small GTPase Rab3D promotes cancer progression and metastasis. *Oncotarget* 6, 11125–11138.
- Yang, J., Zhang, Z., Zhang, Y., Ni, X., Zhang, G., Cui, X., Liu, M., Xu, C., Zhang, Q., Zhu, H., et al. (2019). ZIP4 promotes muscle wasting and cachexia in mice with orthotopic pancreatic tumors by stimulating RAB27B-regulated release of extracellular vesicles from cancer cells. *Gastroenterology* 156, 722-734.e6.
- Yao, M., Ventura, P.B., Jiang, Y., Rodriguez, F.J., Wang, L., Perry, J.S.A., Yang, Y., Wahl, K., Crittenden, R.B., Bennett, M.L., et al. (2020). Astrocytic trans-differentiation completes a multicellular paracrine feedback loop required for medulloblastoma tumor growth. *Cell* 180, 502-520.e19.
- Yuan, Y., Jiang, Y.-C., Sun, C.-K., and Chen, Q.-M. (2016). Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). *Oncol. Rep.* 35, 2499–2515.
- Yue, X., Lan, F., and Xia, T. (2019). Hypoxic glioma cell-secreted exosomal miR-301a activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes radiation resistance by targeting TCEAL7. *Mol. Ther.* 27, 1939–1949.
- Zhang, L., Zhang, S., Yao, J., Lowery, F.J., Zhang, Q., Huang, W.-C., Li, P., Li, M., Wang, X., Zhang, C., et al. (2015). Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal

microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature* 527, 100–104.

Zhang, L., Xie, B., Qiu, Y., Jing, D., Zhang, J., Duan, Y., Li, Z., Fan, M., He, J., Qiu, Y., et al. (2020). Rab25-mediated EGFR recycling causes tumor acquired radioresistance. *IScience* 23, 100997.

Zhao, H., Wang, Q., Wang, X., Zhu, H., Zhang, S., Wang, W., Wang, Z., and Huang, J. (2016). Correlation between RAB27B and p53 expression and overall survival in pancreatic cancer. *Pancreas* 45, 204–210.

Zhao, S., Torii, S., Yokota-Hashimoto, H., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). Involvement of Rab27b in the regulated secretion of pituitary hormones. *Endocrinology* 143, 1817–1824.