

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

藤田 聡より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 542 号

学位申請者 : 藤 田 聡

学位審査論文 : Effects of fractionated radiation on murine glioma stem cell metabolism

(放射線治療後のグリオーマ幹細胞における代謝変化の解析)

著 者 : Satoshi Fujita, Satoru Osuka, Shunsuke Shibao, Kaori Igarashi, Tomoyoshi Soga, Oltea Sampetean

公 表 誌 : Toho Journal of Medicine 2 (2) : 2016

論文内容の要旨 :

《背景》 膠芽腫では、初期治療後の再発が予後を大きく左右する。多くの癌腫における腫瘍塊の再構築に、自己複製能、腫瘍形成能の高いがん幹細胞が大きな役割を演じていることが知られており、膠芽腫においてもグリオーマ幹細胞 (Glioma stem cell ; GSC) が存在し、再発巣の形成に関与していることが報告されている。しかし、非がん幹細胞がエネルギー源として好気性解糖経路を用いることが多くの癌腫で証明されている一方、がん幹細胞がどのような代謝経路を利用しているかは未だによく知られておらず、GSC の代謝特性についても未だ不明な点が多い。我々は、マウスモデルを用いた先行研究において、未治療の幹細胞様腫瘍細胞の中に解糖経路を利用する分画と酸化的リン酸化を利用する分画が存在することを見出した。また、分割放射線療法を行うことで GSC の性質が徐々に変化し、insulin like growth factor 1 (IGF1) シグナル伝達経路が活性化して増殖が遅くなり、放射線に対する抵抗性が上昇することを報告した。

《目的》 今回、治療後の GSC における増殖速度の低下がエネルギー産出経路の変化を伴うか否かを検証するため、分割照射前後の GSC の代謝特性を比較検討した。

《方法》 *Ink4a/Arf*^{-/-}マウス由来の神経幹細胞に H-RasV12 を過剰発現させ、得られた細胞を同系マウスの前脳に移植し膠芽腫様腫瘍を形成させた。腫瘍内の幹細胞分画 (tumorspheres, TS) を単離し、TS に *in vitro* で 60Gy の分割放射線照射を行い、残存した細胞分画 (TS-RR) を単離・培養した。さらに、シングルセルクローニングを用いて、TS、TS-RR から複数のクローン

を樹立した。放射線抵抗性が低い TS クローン及び放射線抵抗性が高い TS-RR のクローンを 5 つずつ選択し、グルコース消費、乳酸産生を測定し、細胞外フラックス解析、細胞内代謝産物のメタボローム解析を行った。

《結果》TS と TS-RR のクローンに対しコロニー形成アッセイにて放射線抵抗性を検証したところ、TS-RR クローンで形成されたコロニーの数が有意に多く、放射線抵抗性が高いことが確認された。また、TS クローン 7 番、TS-RR クローン 17 番をマウスの前脳に移植した結果、TS-RR クローン移植群の生存が長く、腫瘍細胞の増殖が遅いことが示された。細胞外代謝産物の測定より、TS-RR クローンではグルコース消費量、乳酸産生が TS クローンと比較して有意に低いことがわかり、細胞内 ATP 量もわずかに低いことがわかった。また、細胞外フラックス解析では、TS-RR クローン 17 では細胞外酸化速度および酸素消費速度が TS クローン 7 と比較して低い値を示した。メタボローム解析において、解糖経路の中間代謝産物である G6P、F1,6-BP、乳酸の細胞内含量が TS-RR クローンで有意に低く、R5P、S7P などのペントースリン酸回路関連代謝産物、ヌクレオシド 1 リン酸の細胞内含量も有意に低かった。一方、イソロイシン、メチオニン、トリプトファンを含む一部の必須アミノ酸の含量には TS、TS-RR クローン間で差異は認められなかった。

《考察》分割放射線照射後の GSC では糖消費、乳酸産生が低く、解糖経路の利用の低下が確認された。一方、グルコース消費と異なり、照射前・後の GSC において細胞内 ATP 含量の差が少なかったことから、ATP 産生と ATP 消費の同程度の低下、またはグルコース以外の炭素源の代償利用が考えられるが、細胞の増殖速度も低下していることから、前者の可能性が示唆された。

臨床上、初期治療後の膠芽腫において、GSC が形成する再発巣の早期検出という観点からは、グルコース消費に基づいた検査の有用性は低いと考えられた。一方、治療前・後の GSC のアミノ酸レベルには大きな差がなかったことから、アミノ酸 PET が再発巣の早期検出に有用である可能性が示唆された。

また近年、腫瘍細胞の代謝特性をターゲットとした治療が注目され、代謝阻害薬の評価と開発が進められている。今後、放射線照射後の GSC において優位に上昇している代謝産物を同定することにより、膠芽腫の治療成績の向上につながるものと期待される。

《結語》膠芽腫の治療後の再発を引き起こす GSC の代謝特性が治療前の幹細胞の特性と異なることが示唆され、大きく変動する代謝経路に解糖経路が含まれることが明らかになった。GSC の代謝特性を解析することで、再発をより早い段階で発見・診断できる可能性が示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 542 号	氏 名	藤 田 聡
学位審査担当者	主 査	周 郷 延 雄
	副 査	高 松 研
	副 査	藤 岡 俊 樹
	副 査	榊 原 隆 次
	副 査	五 味 達 哉

学位審査論文の審査結果の要旨 :

膠芽腫は最も悪性度の高い原発性脳腫瘍である。脳内を浸潤性に発育するために手術による全摘出は困難であり、術後の放射線治療は欠かせない。しかし、治療後の局所再発を避けることはできずその予後は不良である。膠芽腫が局所再発する原因のひとつとしては、腫瘍内に存在する腫瘍幹細胞の治療不応性、特に放射線抵抗性が考えられている。

本論文は、マウスから形成した膠芽腫幹細胞を用いて、その放射線治療抵抗性を示す膠芽腫幹細胞の代謝変化を検討した。実験方法は、はじめに *Ink4a/Arf*^{-/-}マウス由来の神経幹細胞に *H-RasV12* を過剰発現させ、得られた細胞を同系マウスに移植して膠芽腫様腫瘍を形成させた。腫瘍内の幹細胞分画 (tumorspheres, TS) を単離し、60Gy の分割放射線照射を行って残存した細胞分画 (tumorspheres →radioresistance: TS-RR) のクローンと、照射していない TS クローンにおいて、グルコース消費、乳酸産生、細胞外フラックス解析、細胞内代謝産物のメタボロームを比較した。その結果、TS に比して TS-RR は細胞増殖が遅く、グルコース消費量や乳酸産生は有意に低かった。また、TS-RR はメタボローム解析において解糖経路の中間代謝産物も低かった。一方、必須アミノ酸の含量には差異はなかった。これにより、膠芽腫幹細胞は治療前後で代謝特性が異なること、特に解糖経路が変化していることを明らかにした。

平成 28 年 5 月 24 日の学位審査会は、審査員 5 名全員の出席のもとに行われ、研究要旨の発表の後、活発な議論がなされた。質問の内容は、TS-RR に対して 60Gy の照射線量を行った根拠は何か、TS-RR で IGF1R が増加している機序、TS と TS-RR の予後の差異、メチオニン positron emission tomography (PET) での腫瘍への集積と TS-RR との関係、TCA サイクルや解糖系と IGF1R の関係、TS-RR において乳酸産生やグルコース消費量が低下しているのは、単に増殖能が低いからではないか、さらには、掲載されているグラフに関する詳細な指摘等、様々な質問に対して藤田氏は明確に真摯に答えた。

本研究は、放射線治療抵抗性を示す膠芽腫幹細胞の代謝変化を明らかにし、今後、腫瘍幹細胞の代謝特性を標的とした新たな治療薬へとつながる新知見であると考えられた。また、膠芽腫幹細胞の代謝変化をとらえるための PET 検査における新たなアミノ酸製剤やブドウ糖製剤などの開発の一助になることが期待された。以上の審議結果より本研究は学位授与に値すると判定し、審議を終了した。