

悪性神経膠腫における  
TRAIL と IFN- $\beta$ の併用による抗腫瘍効果の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系脳神経外科学専攻

吉村 相大

修了年 2019 年

指導教員 吉野 篤緒

# 目次

概要	1
緒言	4
対象と方法	7
結果	12
考察	14
結論	17
謝辞	18
図・図説	19
引用文献	27
研究業績	33

## 概要

膠芽腫を含む悪性神経膠腫は中枢神経系に原発する腫瘍であり、近年の手術、放射線療法並びに化学療法を組み合わせた集学的治療の進歩にも関わらず、極めて予後不良である。悪性神経膠腫は浸潤性に発育するため、手術により全ての腫瘍細胞を除去することは極めて困難であり、また、放射線療法の効果も限定的であるため治療成績の改善には化学療法の発展が必要不可欠である。

Tumor necrosis factor (TNF) related apoptosis inducing ligand (TRAIL) は TNF ligand super family に属し、death receptor (DR) 4、DR5 といった細胞膜の特異的受容体への結合を介してアポトーシス誘導シグナルを細胞内に伝達するサイトカインである。TRAIL は腫瘍細胞に比較的特異的にアポトーシスを誘導するため、抗腫瘍薬としての臨床応用が期待されている。しかし、TRAIL によるアポトーシスの誘導に抵抗性を示す腫瘍も存在し、悪性神経膠腫はその一つである。こうした TRAIL 誘導アポトーシスに対する抵抗性に関し様々な検討がなされており、他剤との併用により TRAIL の抗腫瘍効果を増強させ得たという報告が散見される。

Interferon-beta (IFN- $\beta$ ) は抗ウイルス作用を持つサイトカインで、免疫賦活作用や抗血管新生作用に加え、増殖抑制やアポトーシスの誘導による抗腫瘍効果を有する。IFN- $\beta$ は細胞膜に存在する受容体である interferon- $\alpha/\beta$  receptor (IFNAR) と結合し、janus kinase (JAK) -signal transducer and activator of transcription (STAT) 系を介したシグナル伝達により interferon stimulated genes (ISGs) と呼ばれる遺伝子群の発現を亢進させる。現在までに、300 を超える ISGs が同定されているが、その中には TRAIL、Fas も含まれており、IFN- $\beta$ と外因系アポトーシス経路との関連が指摘されている。

これまでに TRAIL と IFN- $\beta$ の併用による悪性神経膠腫に対する抗腫瘍効果を検討した報告はない。そこで、TRAIL との crosstalk も考慮し、抗腫瘍効果を増強させ得る物質として IFN- $\beta$ に着目し、悪性神経膠腫細胞株に対する TRAIL と IFN- $\beta$ の抗腫瘍効果について検

討した。

7種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、AM-38、T-98G、U-87MG、U-138MG、U-251MG、YH-13) を用いて、TRAIL 単剤、IFN- $\beta$ 単剤、TRAIL と IFN- $\beta$ の併用による細胞増殖抑制実験を行った。TRAIL 単剤、IFN- $\beta$ 単剤ともに濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示した。また、TRAIL、IFN- $\beta$ 併用では TRAIL 単剤と比較し、A-172、AM-38、T98G、U-138MG、U-251MG において有意に細胞増殖抑制効果の増強を認めた。

U-138MG を用いた fluorescence-activated cell sorter (FACS) による解析では、TRAIL、IFN- $\beta$ 併用群において Annexin V と PI の両者に染まる細胞の割合が増加しており、アポトーシス誘導が増強することが示唆された。このことは併用群において、Western blotting により cleaved caspase 3、cleaved caspase 8 が検出されたことにより裏付けられた。一方、TRAIL と IFN- $\beta$ の併用によりアポトーシス誘導が増強されるメカニズムを調べるため、アポトーシス関連遺伝子 (DR4、DR5、Fas、cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP)、p53、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) associated x protein (Bax)) の発現を real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) で定量した。その結果、IFN- $\beta$ を加えることにより DR5、Fas、p53 の発現亢進を認めた。さらに、IFN- $\beta$ による TRAIL 誘導アポトーシスの増強が DR5 の発現亢進に依存することを確認するため、DR5 阻害抗体を用い細胞増殖実験を行った。その結果、TRAIL と IFN- $\beta$ 併用による細胞増殖抑制効果は、DR5 阻害抗体の濃度依存的に有意に減弱した。このことから悪性神経膠腫細胞株における TRAIL、IFN- $\beta$ 併用によるアポトーシス誘導効果において、DR5 が重要な役割を果たしていると考えられた。

以上の実験より、IFN- $\beta$ が DR5 の発現を亢進させ、悪性神経膠腫細胞株において TRAIL 誘導アポトーシスを増強させることが示唆され、TRAIL と IFN- $\beta$ の併用は悪性神経膠腫に対する新たな治療戦略になり得ると考えられた。

本論文で用いた略語一覧

DcR	decoy receptor
DD	death domein
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DR	death receptor
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FADD	Fas associated death domain
IFN	interferon
ISGs	IFN-stimulated genes
JAK	janus kinase
OPG	osteoprotegrin
PI	propidium iodide
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
STAT	signal transducer and activator of transcription
TMZ	temozolomide
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand

## 緒言

神経膠腫は神経膠細胞に由来する腫瘍であり、原発性脳腫瘍の約 25%を占める<sup>1</sup>。世界保健機関（World Health Organization: WHO）は神経膠腫を臨床的悪性度に基づき grade I ~IVの4段階に分類しており、grade III、grade IVの神経膠腫は悪性神経膠腫と呼ばれる<sup>2</sup>。Grade IVに分類される膠芽腫の標準治療は、手術による最大限の腫瘍摘出と術後の放射線療法および temozolomide (TMZ) による化学療法であるが、そのような集学的治療を行っても全生存期間中央値は 14.6 ヶ月と極めて予後不良である<sup>3</sup>。悪性神経膠腫は浸潤性に増殖するため、手術により全ての腫瘍細胞を除去することは極めて困難である。また、放射線療法の効果も限定的であるため<sup>4</sup>、予後を改善するためには化学療法の発展が必要不可欠である。他癌種の治療において、免疫チェックポイント阻害剤を含む免疫療法や、分子標的薬が近年注目されているが、悪性神経膠腫治療における有効性は示されていない<sup>5</sup>。

現在、開発もしくは使用されている抗腫瘍薬の多くは、細胞をアポトーシスに誘導することにより、その効果を発揮する。細胞におけるアポトーシス誘導機構には大きく分けて2つの経路が存在し、それぞれ内因系経路と外因系経路と呼ばれている<sup>6</sup>。内因系経路はミトコンドリアを介する経路で、DNA 障害、酸化ストレスや小胞体ストレスによって活性化される<sup>7</sup>。まず、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) Homology (BH) 3-only タンパク質である BH3 interacting-domain death agonist (Bid)、Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim)、Bcl-2 associated death promotor (Bad)、Noxa、p53 upregulated modulator of apoptosis (Puma) がミトコンドリアに移動し、Bcl-2 associated x protein (Bax) や Bcl-2 antagonist/killer (Bak) といったアポトーシス促進因子と結合することでそれらを活性化する。そして、ミトコンドリア外膜の透過性が亢進し cytochrome c が細胞質へ放出されることにより、caspase 9 や実行役の caspase 3 が活性化され、細胞をアポトーシスに誘導する<sup>8</sup>。一方、外因系経路はミトコンドリアを介さない経路で、細胞膜に存在する tumor necrosis factor (TNF) receptor や、Fas、death receptor (DR) 4、DR5 といった受容体とそれぞれのリガンドが結合することに

より活性化される<sup>9</sup>。これらの受容体は細胞内に death domain (DD) と呼ばれるドメインを持つ。受容体がりガンドと結合すると、受容体に構造変化が引き起こされ、DD とアダプター分子である Fas associated death domain (FADD) が会合し、さらに caspase 8 と結合することにより death-inducing signaling complex (DISC) と呼ばれるタンパク質複合体を形成する<sup>10</sup>。これにより caspase 8 が活性化され、活性型となった caspase 8 は実行役の caspase 3 を活性化し、アポトーシスを誘導する<sup>11</sup> (Figure 1)。

外因系のアポトーシスを活性化し、誘導する因子として、TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) が注目されてきた<sup>12-15</sup>。TRAIL は TNF ligand super family に属し、特異的受容体との結合を介し、アポトーシス誘導シグナルを細胞内に伝達する<sup>12-15</sup>。TRAIL の受容体として、DR4、DR5、decoy receptor (DcR) 1、DcR2、osteoprotegerin (OPG) の5種類が知られている<sup>16</sup>。このうち TRAIL との結合によりアポトーシスを誘導するものは DR4 と DR5 のみである<sup>16</sup>。TRAIL は DR4、DR5 と結合することにより、前述した外因系のアポトーシス経路を活性化させる。DR4、DR5 は腫瘍細胞で高発現するとともに、正常細胞では発現が限られており<sup>17, 18</sup>、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する抗腫瘍薬としての臨床応用が期待されてきた。しかし、TRAIL によるアポトーシスの誘導に抵抗性を示す腫瘍も存在し、悪性神経膠腫はその一つである<sup>19</sup>。悪性神経膠腫の検体を用いた研究では、75%に DR4、95%に DR5 の発現を認めたとされるが、TRAIL 単剤で有効な成績を示した報告はほとんどない<sup>20</sup>。こうした TRAIL に対する抵抗性に関して、様々な検討がなされているとともに、他剤を併用することにより抗腫瘍効果を増強させ得たという報告が散見されている<sup>21-25</sup>。悪性神経膠腫では、cisplatin、bortezomib (proteasome inhibitor)、rapamycin (mTOR inhibitor) などとの相乗効果を示した報告が散見されるが<sup>19</sup>、臨床試験には至っていない。

当教室では、予てより IFN- $\beta$ に注目してきた。星細胞腫 (WHO grade II) においては手術摘出度と IFN- $\beta$ 療法が有意な予後因子であること<sup>26</sup>、悪性神経膠腫 (WHO grade II and III) においては IAR (IFN- $\beta$ +ACNU+放射線療法) が有効であることなどを報告してきた<sup>27</sup>。また、悪性神経膠腫細胞株を用いた基礎研究で、標準治療薬である TMZ に対する耐性

細胞において、IFN- $\beta$ と TMZ を併用する事により、TMZ の耐性に関与する MGMT の発現を抑制し、相乗的な腫瘍抑制効果を示すことを報告している<sup>28</sup>。

IFN は抗ウイルス作用を持つサイトカインとして発見され、その後、免疫賦活作用や抗血管新生作用に加え、増殖抑制やアポトーシスの誘導による抗腫瘍効果を有することが明らかになり、抗ウイルス薬、抗腫瘍薬として臨床応用されるようになった<sup>29, 30</sup>。IFN は産生細胞の種類により、主に IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  の 3 種類に分類される<sup>31</sup>。また、その受容体により IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ を type- I IFN、IFN- $\gamma$  を type- II IFN と分類する場合もある。IFN- $\beta$  は、悪性神経膠腫細胞株の増殖を抑制することが基礎的研究で報告されているとともに<sup>32</sup>、悪性神経膠腫の治療薬として保険収載されている。現在では、悪性神経膠腫に対して第二世代のアルキル化薬である TMZ が標準治療薬であるが、かつて本邦では、IFN- $\beta$ の抗腫瘍効果を期待して、アルキル化剤であるニトロソウレア (ACNU)、そして放射線療法を組み合わせた IAR 療法が主流であった<sup>33-35</sup>。

IFN- $\beta$ は IFNAR と呼ばれる細胞膜の受容体に結合し、janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) 系を介したシグナル伝達により、IFN-stimulated genes (ISGs) の発現を亢進させることにより作用を発現する。現在までに 300 以上の ISGs が知られているが、その中には TRAIL、Fas といった遺伝子も含まれ、外因系アポトーシスとの強い関与が示唆されている<sup>36,37</sup>。

これまでに TRAIL と IFN- $\beta$ の併用による悪性神経膠腫に対する抗腫瘍効果を検討した報告はない。TRAIL との crosstalk も考慮し、抗腫瘍効果を増強させ得る物質として IFN- $\beta$ に着目し、悪性神経膠腫細胞株に対する TRAIL と IFN- $\beta$ 併用による抗腫瘍効果について検討した。



## 対象と方法

### 悪性神経膠腫細胞株と薬剤

7種類のヒト悪性神経膠腫細胞株、A-172、AM-38、T-98G、U-251MG、YH-13 (Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan)、U-87MG、U-138MG (American Type Culture Collection, VA, USA) を使用した。また、natural type IFN- $\beta$  (Toray Industries, Tokyo, Japan) と TRAIL (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を使用した。

### 細胞の培養方法

細胞株は 75 cm<sup>2</sup> フラスコ (Iwaki, Chiba, Japan) を用いて、10%仔牛血清 (FCS, Life technologies, NY, USA) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) で、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%以上の湿度に調整された恒温器内に入れ培養を行った。

### 細胞増殖抑制実験

7種類の悪性神経膠腫細胞株に対する、TRAIL 単剤、IFN- $\beta$ 単剤、TRAIL と IFN- $\beta$ の併用による細胞増殖抑制効果を評価した。IFN- $\beta$ の濃度は、*in vivo* における髄液中の濃度を考慮して 10 IU/mL とした<sup>28</sup>。

24 穴プレートに  $1 \times 10^4$  個の細胞を撒き、24 時間培養後、TRAIL (0、0.1、1.0、10、100、1,000 ng/mL)、IFN- $\beta$  (0、0.1、1.0、10、100、1,000 IU/mL)、TRAIL (0、0.1、1.0、10、100、1,000 ng/mL) + IFN- $\beta$  10 IU/mL を含む新鮮培地に交換し、72 時間培養した後に Coulter Counter-Z1 (Beckman Coulter, CA, USA) を用いて細胞数を測定した。なお、各測定は 4 回以上施行した。

## アポトーシスの検出

後期アポトーシスもしくはネクローシスに陥っている細胞は、Annexin V と PI の両者に染色されることが知られている<sup>38</sup>。そこで、悪性神経膠腫細胞株における、薬剤投与（TRAIL 単剤、IFN- $\beta$ 単剤、TRAIL と IFN- $\beta$ の併用）によるアポトーシスの誘導を評価するため fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用い、各条件下での細胞株における Annexin V と propidium iodide (PI) の染色性を測定した。

細胞増殖抑制効果は、TRAIL が 1.0 ng/mL 以上で有意となったため、薬剤の濃度を TRAIL 1.0 ng/mL、IFN- $\beta$  10 IU/mL とした。なお、非小細胞癌や B cell lymphoma に対する phase II RCS では 8 mg/kg の投与が行われ、血中濃度は 80  $\mu$ g/mL 程度である。それゆえ、今回使用した TRAIL の容量は臨床的にも低容量であると考えられる<sup>39,40</sup>。

また、以下の検討では、TRAIL 1.0 ng/mL と IFN- $\beta$  10 IU/mL の併用時に最も顕著に細胞増殖抑制効果の増強を認めた U-138MG を検討対象とした。

6 穴プレートに  $1 \times 10^6$  個の細胞を撒き、24 時間培養後に TRAIL 1.0 ng/mL、IFN- $\beta$  10 IU/mL、TRAIL 1.0 ng/mL + IFN- $\beta$  10 IU/mL を含む新鮮培地に交換し、72 時間後に細胞を採取した。遠心後 binding buffer (Wako, Osaka, Japan) 100  $\mu$ L で攪拌し、AnnexinV (Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 conjugate: Life technologies, NY, USA) 5  $\mu$ L および PI (Propidium Iodide Solution: Miltenyi Biotech, CA, USA) 10  $\mu$ L を添加した。10 分室温で処理した後に binding buffer 400  $\mu$ L を添加し、サンプルの全量を 500  $\mu$ L とした。そして、FACS-Caliber flow cytometer (Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて蛍光強度を測定し、Flowjo software (BioLegend, CA, USA) を用いて解析した。

## アポトーシス関連タンパク質の発現解析

アポトーシスの関連因子である Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 のタンパク質発現を Western blotting により評価した。

75 cm<sup>2</sup> フラスコに細胞を撒き 80%増殖飽和まで培養後、細胞を採取した。RIPA buffer

(Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan) でタンパク質を抽出後、15,000 rpm で 30 分間遠心し、上清を採取した。タンパク質濃度は Pierce BCA protein assay reagent (Thermo Scientific, IL, USA) を用いて測定した。タンパク質量を 50  $\mu$ g に調整し、sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。ゲルは 12% SDS-PAGE mini (TEFCO, Tokyo, Japan) を使用した。Bio-Rad トランスブロット (Bio-Rad Laboratories, NJ, USA) を用いゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜 (GE Healthcare, Tokyo, Japan) に転写し、ブロッキング緩衝液 (1% スキムミルク含有 PBS) を用いて 1 時間、室温でブロッキングを行った。その後一次抗体を添加したブロッキング緩衝液で、ニトロセルロース膜を一晩、4°C で処理した。処理後、ニトロセルロース膜を Tween 含有 PBS (PBS-T) で洗浄し、二次抗体を添加したブロッキング緩衝液で 1 時間処理した。ニトロセルロース膜を ECL detection system (GE Healthcare) で処理した後、Las 4000 (GE Healthcare)、Image J (National Institutes of Health, MD, USA) でバンドを解析した。なお、一次抗体として Caspase 3 Rabbit mAb (1:1,000)、Caspase 8 Mouse mAb (1:1,000)、Caspase 9 Mouse mAb (1:1,000) (Cell Signaling Technology, MA, USA) を使用した。二次抗体として Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, MA, USA)、Anti-Mouse IgG (Whole Molecule) Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich Inc, MO, USA) を使用した。

#### アポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現解析

RNeasy Mini Kit (Quiagen, CA, USA) を用いて  $1 \times 10^6$  個の細胞から RNA の抽出を行った。抽出した RNA 量は Nano-drop (Thermo Fisher, IL, USA) を用いて測定した。Real-time qRT-PCR 反応は、SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて、Step-one realtime PCR system (Applied Biosystems, CA, USA) で行った。mRNA の発現量は、Livak<sup>41</sup> らの相対的  $2^{-\Delta\Delta}$  法で求めた相対値で示した。発現量の標準化のために GAPDH を用いた。プライマーは Eurofins Genomics (Eurofins Scientific, Tokyo, Japan) によって合成された。

各遺伝子のプライマー配列を以下に示す<sup>42-45</sup>。

GAPDH (F): 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3'

GAPDH (R): 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3'

DR4 (F): 5'-TGTACGCCTGGAGTGACAT-3'

DR4 (R): 5'-CACCAACAGCAACGGAACAA-3'

DR5 (F): 5'-CAGGTGTCAACATGTTGTCC-3'

DR5 (R): 5'-ATCGAAGCACTGTCTGAGAG-3'

c-FLIP (F): 5'-CGGACTATAGAGTGCTGATGG-3'

c-FLIP (R): 5'-GATTATCAGGCAGATTCCTAG-3'

p53 (F): 5'-GGCCCACTTCACCGTACTAA-3'

p53 (R): 5'-CTGGTTTCAAGGCCAGATGT-3'

BAX (F): 5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3'

BAX (R): 5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'

qRT-PCR 反応溶液は 2  $\mu$ L の forward 及び reverse プライマー (10 pmol)、2  $\mu$ L の 50 mM Mn (OAc) 2、1  $\mu$ L の SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)、0.8  $\mu$ g の RNA 及び RNase-free water を含む総容量 20  $\mu$ L とした。

反応条件は、95°C 30 秒、61°C 20 分、95°C 1 分の後、95°C 15 秒、55°C 15 秒、74°C 45 秒を 40 サイクル施行するよう設定し、実施した。なお、real-time qRT-PCR による測定は同一実験を 3 回以上施行した。

### **DR5 阻害抗体を用いた DR5 阻害実験**

24 穴プレートに  $5 \times 10^4$  個の細胞を撒き、24 時間培養後、TRAIL 1.0 ng/mL + IFN- $\beta$  10 IU/mL に DR5 阻害抗体 (Recombinant Human TRAIL R2/TNFRSF10B Fc Chimera Protein, R&D SYSTEME, MN, USA) (0、2.5、5、10 ng/mL) を含む新鮮培地に交換し、72 時間培養した後に Coulter Counter-Z1 (Beckman Coulter) を用いて細胞数を測定した。

## 統計解析

全ての実験は、3回以上繰り返し行った。同一実験を6回以上行っているものは、平均値および標準誤差 (SE) を算出して表記した。2群間のデータの比較には Mann-Whitney's U test を行った。3群以上の比較には Kruskal-Wallis test を行い、有意差があった場合には、その後の検定として t 検定を用いた。なお、データの解析は統計ソフト SPSS (version 21: IBM, NY, USA) を使用した。

## 結果

### 悪性神経膠腫細胞株に対する細胞増殖抑制効果

TRAIL 単剤、IFN- $\beta$ 単剤、および TRAIL と IFN- $\beta$ 併用による悪性神経膠腫に対する抗腫瘍効果を評価するため、培地に各薬剤を添加し、72 時間後の細胞数を計測した。7 種類全ての悪性神経膠腫細胞株において、TRAIL、IFN- $\beta$ ともに濃度依存的な細胞増殖抑制効果を認めた (Figure 2)。また、TRAIL 0~1,000 ng/mL に IFN- $\beta$  10 IU/mL を併用することにより、A-172、AM-38、T98G、U-138MG、U-251MG において TRAIL 単剤と比較し、より強い細胞増殖抑制効果を認めた。一方、U-87MG と YH-13 では TRAIL 単剤群と TRAIL IFN- $\beta$  併用群で有意な差を認めなかった (Figure 3)。

特に U-138MG は、IFN- $\beta$  10 IU/mL との併用時に、少量 (0.1 ならびに 1 ng/mL) の TRAIL において最も細胞増殖抑制効果が強く、上記方法でも記載したが以下の検討では同細胞株を用いた。

### 薬剤投与によるアポトーシス誘導の評価

悪性神経膠腫細胞株に対する TRAIL 単剤、IFN- $\beta$ 単剤、および TRAIL と IFN- $\beta$ の併用によるアポトーシス誘導効果を評価するため、Annexin V および PI による二重染色を行い、染色される細胞の割合を FACS で評価した。両者に陽性となる細胞は後期アポトーシスまたはネクローシスの状態にあると考えられている。なお、細胞株は、前述の細胞増殖抑制実験において TRAIL と IFN- $\beta$ の併用によって顕著に細胞増殖抑制効果の増強を認めた U-138MG を使用した。

U-138MG において、TRAIL 単剤により  $3.65 \pm 1.81\%$  の細胞が、IFN- $\beta$ 単剤では  $4.29 \pm 1.13\%$  の細胞が Annexin V および PI に陽性であったが、TRAIL と IFN- $\beta$ を併用すると、その割合は  $7.22 \pm 1.68\%$  に増加した (Figure 4)。

## Caspase 活性の評価

TRAIL 単剤、IFN- $\beta$ 単剤、および TRAIL と IFN- $\beta$ 併用下における caspase の活性を検討するために、U-138MG に各薬剤添加 24 時間後の Caspase 3、Caspase 8、Caspase 9 のタンパク質発現を Western blotting により解析した。

TRAIL、IFN- $\beta$ 併用において、Caspase 3、Caspase 8 の切断 (cleavage) が見られた。一方、Caspase 9 に関しては各群間で差を認めなかった (Figure 5)。

## アポトーシス関連遺伝子の発現の評価

TRAIL と IFN- $\beta$ のクロストークを一部検証するために、IFN- $\beta$ による TRAIL 誘導アポトーシス関連遺伝子の変化を検討した。

培地に IFN- $\beta$  10 IU/mL を添加し、4 時間後の U-138MG における DR4、DR5、Fas、c-FLIP、p53、Bax の mRNA 発現を real-time qRT-PCR により解析した。IFN- $\beta$  10 IU/mL により、p53、Fas、DR5 の有意な発現亢進を認めた。一方、DR4、c-FLIP、Bax の mRNA 発現には変化を認めなかった (Figure 6)。

## DR5 阻害抗体を用いた細胞増殖実験

TRAIL との結合によりアポトーシスを誘導する受容体は、DR4 と DR5 のみであることが知られている<sup>16</sup>。上記検討では、IFN- $\beta$ により DR4 の発現亢進は認められなかったが、DR5 の発現の亢進が確認された。そこで、TRAIL と IFN- $\beta$ の併用における抗腫瘍効果の増強には、DR5 が主に関わっていると考え、DR5 阻害抗体を加えて細胞増殖抑制効果を検討した。

U138-MG を用いて、TRAIL 1.0 ng/mL と IFN- $\beta$  10.0  $\mu$ g/mL を培地に添加した 72 時間後の生存細胞数と、DR5 阻害抗体 (2.5、5、10 ng/mL) を加えた時の生存細胞数を比較した。TRAIL と IFN- $\beta$ 併用では、生存細胞は untreated に対して平均  $39.4 \pm 10.4\%$ であったのに対し、DR5 阻害抗体 (2.5、5、10 ng/mL) を加えた時には、それぞれ、平均  $54.8 \pm 9.0\%$ 、 $77.4$

±8.5%、82.8±5.1%であり、DR5 阻害抗体は濃度依存的に有意に TRAIL、IFN-β併用による抗腫瘍効果を減弱させた (Figure 7)。



## 考察

TRAIL は腫瘍細胞に比較的特異的にアポトーシスを誘導するとされ<sup>17,18</sup>、副作用の少ない抗腫瘍薬として臨床応用が期待されてきた<sup>18</sup>。しかし、TRAIL が誘導するアポトーシスに抵抗性を示す腫瘍も存在し、悪性神経膠腫はその一つである<sup>19</sup>。ただし、様々な検討がなされており、他剤との併用や、放射線照射と組み合わせることにより TRAIL 誘導アポトーシスを増強したとの報告も散見される<sup>21-25,46</sup>。

今回、TRAIL が誘導するアポトーシスを増強させ得る薬剤として IFN- $\beta$  に注目した。IFN- $\beta$  の効果は ISGs の発現によって調節されている<sup>36</sup>。ISGs には Fas、TRAIL といった遺伝子が含まれており、外因系アポトーシスとの関連が指摘されている<sup>37</sup>。本研究では悪性神経膠腫細胞株における、TRAIL と IFN- $\beta$  の併用による抗腫瘍効果を評価し、そのメカニズムについても検討を行った。

まず、7 種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、AM-38、T-98G、U-87MG、U-138MG、U-251MG、YH-13) に対する TRAIL 単剤、IFN- $\beta$  単剤、TRAIL と IFN- $\beta$  の併用による細胞増殖抑制効果を検討した。7 種類全ての細胞株において、TRAIL、IFN- $\beta$  は濃度依存的な抗腫瘍効果を示した。悪性神経膠腫細胞株における、IFN- $\beta$  による細胞増殖抑制効果は過去に報告されているが<sup>28</sup>、本実験においても矛盾のない結果が得られた。一方、細胞株における TRAIL の感受性に関しては様々な報告があり<sup>47-49</sup>、見解の一致をみていない。今回の実験では、細胞株間で効果に差はあるものの、全ての細胞株で TRAIL の濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認めた。また、A-172、AM-38、T98G、U-138MG、U-251MG においては、IFN- $\beta$  と TRAIL の併用により、単剤と比較し細胞増殖抑制効果の増強が認められた。過去に IFN- $\beta$  と TRAIL の併用による抗腫瘍効果を検討した報告はなく、新しい知見であると考えている。一方、7 種類のうち 2 種類の悪性神経膠腫細胞株、U-87MG と YH-13、では併用による細胞増殖抑制効果の増強は認められなかった。今回の検討において、TRAIL と IFN- $\beta$  の併用は、悪性神経膠腫に対して抗腫瘍効果を期待できる薬剤の組み合わせであると考えられた。

今後は、現在の標準治療薬である TMZ との 3 剤併用による抗腫瘍効果の検討や、今回確認された IFN- $\beta$  と TRAIL の併用に対する感受性の違いにおける背景などを解明することが課題と考えている。

次に、アポトーシス誘導効果を評価するため、U-138MG を用いて、FACS による Annexin V および PI の二重染色と Western blotting によるタンパク質の発現解析を行った。TRAIL と IFN- $\beta$  を併用した群では、TRAIL 単剤や IFN- $\beta$  単剤と比較し Annexin V および PI 陽性細胞の割合が増加し、後期アポトーシスもしくはネクローシスに陥っている細胞が増加していることが確認された。さらに、TRAIL と IFN- $\beta$  を併用した群では、外因系アポトーシスに関与している Caspase 8 と Caspase 3 の活性が亢進することが明らかになったが、内因系アポトーシス経路に関与する Caspase 9 に関しては活性の亢進は認めなかった。TRAIL と IFN- $\beta$  の併用による抗腫瘍効果として、外因系を介してアポトーシスの誘導が増強すると考えられた。

悪性神経膠腫細胞株において、cisplatin などの白金製剤や、放射線照射が DR5 の発現を亢進させるという報告がある<sup>46,50</sup>。今回の実験で、IFN- $\beta$  によっても DR5 の発現が亢進することが確認された。一方、同実験において DR4 に関しては有意な発現亢進を認めなかった。このことから、IFN- $\beta$  が TRAIL の受容体である DR5 の発現を亢進させることにより外因系アポトーシス誘導効果を増強させ、抗腫瘍効果を増強させることが示唆された。さらに、IFN- $\beta$  による TRAIL 誘導アポトーシスの増強が DR5 の発現亢進に依存することを確認するため、TRAIL、IFN- $\beta$  併用時に DR5 阻害抗体を追加し細胞増殖抑制実験を行った。その結果、TRAIL と IFN- $\beta$  併用による細胞増殖抑制効果は、DR5 阻害抗体の濃度依存的に有意に減弱した。このことより、TRAIL と IFN- $\beta$  の併用が悪性神経膠腫細胞株にアポトーシスを誘導する過程において、DR5 の発現亢進が重要な役割を持つと考えられた。

悪性神経膠腫細胞株において、IFN- $\beta$  は p53 の発現を亢進させることが知られている<sup>9</sup>。今回の実験においても p53 の発現亢進を認め、矛盾のない結果であった。p53 は DR5 の発現を亢進させることが知られており<sup>51</sup>、p53 の発現亢進が DR5 の発現亢進に寄与している

可能性も考えられた。また、外因系アポトーシスを誘導する受容体の一つである Fas も、IFN- $\beta$ により発現亢進を認めた。これらが TRAIL に IFN- $\beta$ を併用したことにより細胞増殖抑制効果が増強したメカニズムの一部と考えられた。

一方、TRAIL が DR4 や DR5 に結合することにより活性化されるアポトーシスのカスケードにおいて (Figure 1)、c-FLIP は Caspase 8 と競合し、FADD に結合することによってアポトーシスを阻害することが知られている<sup>52</sup>。c-FLIP は、腫瘍細胞において一定量発現していると報告されている<sup>52,53</sup>。そして、種々の薬剤を負荷することにより c-FLIP の発現を低下させ、TRAIL によるアポトーシス誘導を増強させ得たという報告が散見される<sup>52-56</sup>。そこで、IFN- $\beta$ 投与によっても同様に c-FLIP の発現が低下するかを検討した。しかし、今回の実験では IFN- $\beta$ 投与による c-FLIP の有意な発現低下を認めなかった。今後の検討は必要ではあるが、IFN- $\beta$ による c-FLIP の発現低下は否定的であることが示唆された。

今回の研究において、TRAIL と IFN- $\beta$ の併用投与は、悪性神経膠腫に対する新たな治療戦略になり得ることが示唆された。しかし、各薬剤投与条件下での caspase 活性、アポトーシス関連遺伝子の発現、DR5 阻害抗体追加投与による細胞増殖抑制効果の変化に関しては U-138MG 以外の細胞で検討を行っておらず、他の細胞株においても同等の結果が得られることを確認する必要がある。また、今後臨床応用を目指す上で、*in vivo*における抗腫瘍効果に関しても検討を行う必要があると考えている。

## まとめ

悪性神経膠腫細胞株において、IFN- $\beta$ が TRAIL の抗腫瘍効果を増強させることが示された。その作用機序のひとつとして、IFN- $\beta$ が DR5 の発現を亢進させることにより、TRAIL 誘導アポトーシスを増強させることが考えられた。TRAIL と IFN- $\beta$ の併用は、悪性神経膠腫に対する新たな治療戦略になり得ることが示唆された。なお、本研究は悪性神経膠腫細胞株を用いた *in vitro* の実験である。臨床応用に向けて、さらなる TRAIL の抗腫瘍効果の検討、ならびに悪性神経膠腫に対する標準治療薬である TMZ との 3 剤併用における有効性などを検討していく必要がある。また、*in vivo* な研究も必要不可欠であると考えている。

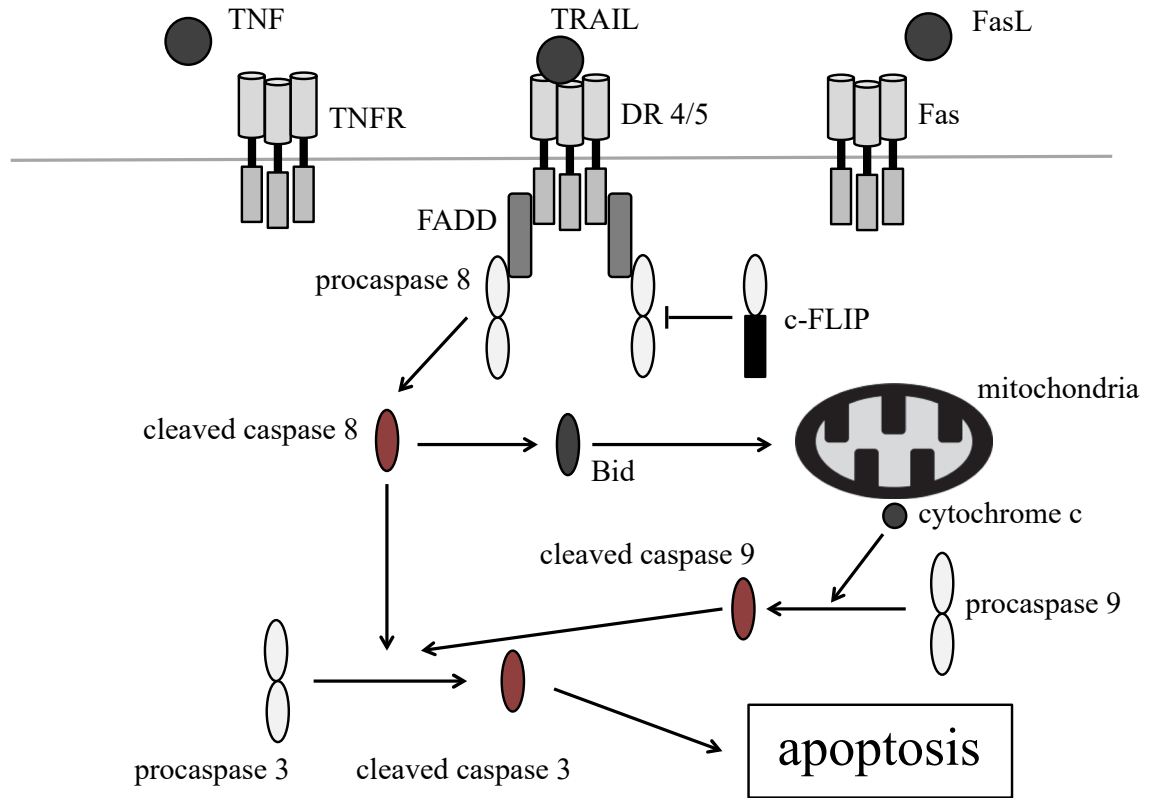
## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、多くの方々よりご支援とご指導を賜りました。指導教官である日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野教授の吉野篤緒先生、日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野准教授の原弘之先生に深く感謝いたします。

実験の実施にあたり、東京大学大学院新領域創成科学研究科特任研究員である佐野恵海子先生、東京大学大学院新領域創成科学研究科教授である上田卓也先生に多大なる協力を得たことを記すとともに心より感謝いたします。また、数多くの貴重なご助言を頂いた日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野の角光一郎先生、落合祐之先生、山室俊先生、槇田浩太郎先生、花島裕也先生に心より感謝申し上げます。

図・表

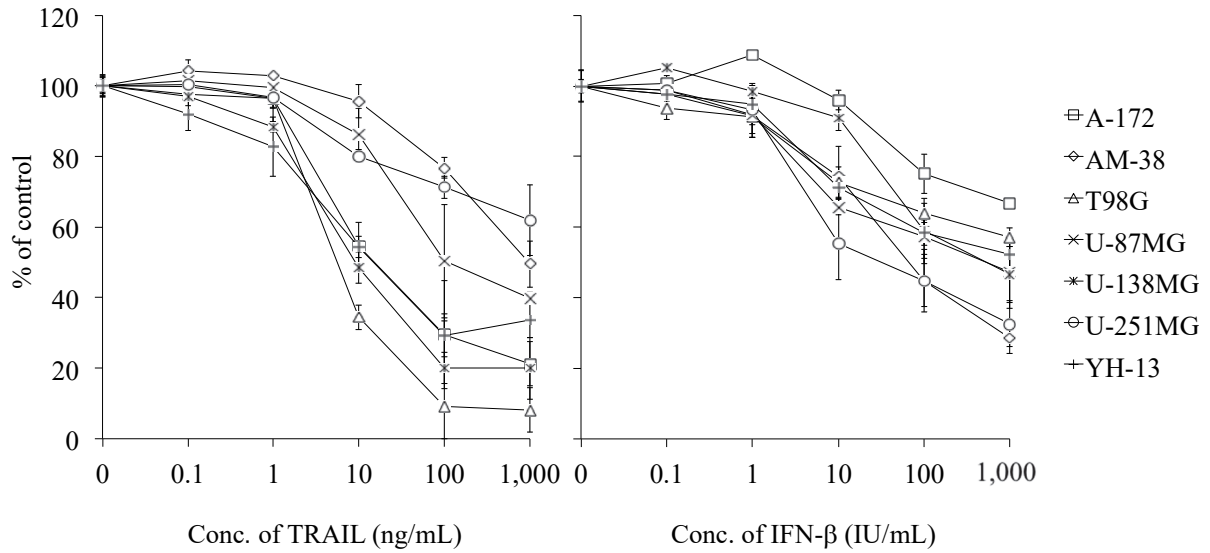
Figure 1. アポトーシス経路



TRAIL が DR4 または DR5 に結合すると、受容体の細胞内ドメインに FADD と caspase 8 が結合し、caspase 8 が活性化される。活性化された caspase 8 は実行役の caspase 3 を活性化し、アポトーシスを引き起こす。また、活性化された caspase 8 は Bid を切断し、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出を引き起こす。それにより caspase 9 と下流の caspase 3 が活性化され、アポトーシスが誘導される経路も知られている。

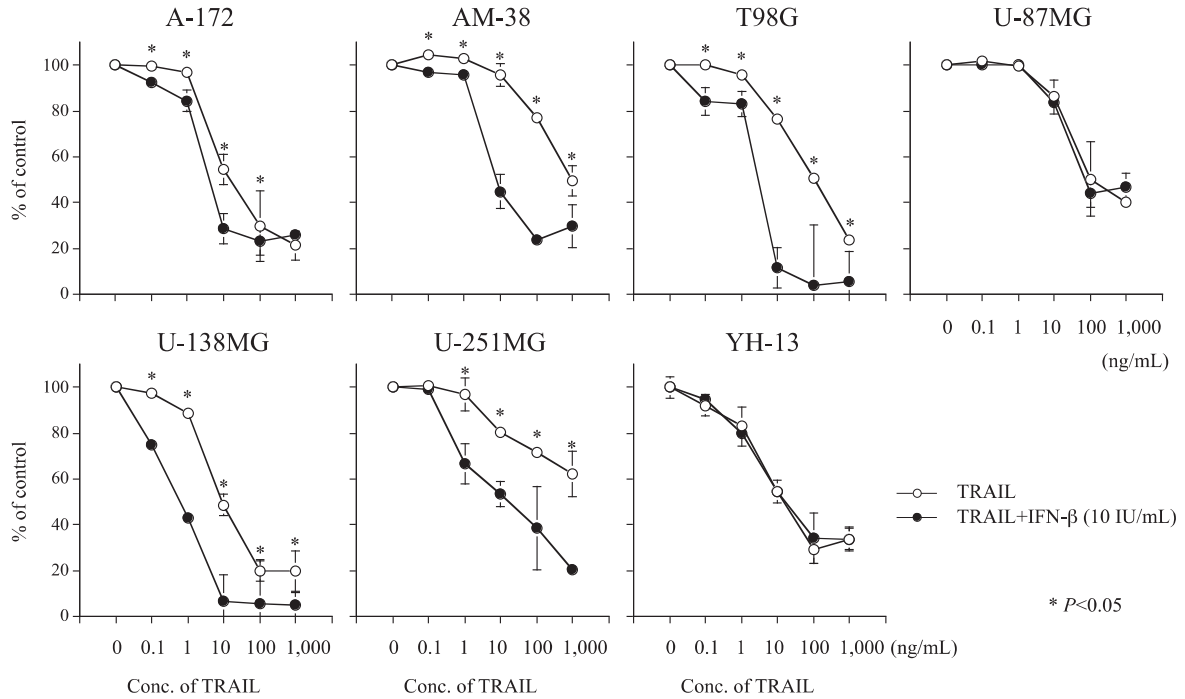
一方、c-FLIP は caspase 8 と競合し FADD に結合することによってアポトーシスを阻害する。

Figure 2. TRAIL または IFN- $\beta$  単剤による細胞増殖抑制効果



7 種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、AM-38、T-98G、U-87MG、U-138MG、U-251MG、YH-13) に、0~1,000 ng/mL の TRAIL、または 0~1,000 IU/mL の IFN- $\beta$  を培地に加え、細胞増殖抑制効果を評価した。TRAIL (左図)、IFN- $\beta$  (右図) とともに、全ての細胞株において、濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認めた。なおデータは、平均 $\pm$ SE (標準誤差) として示した。

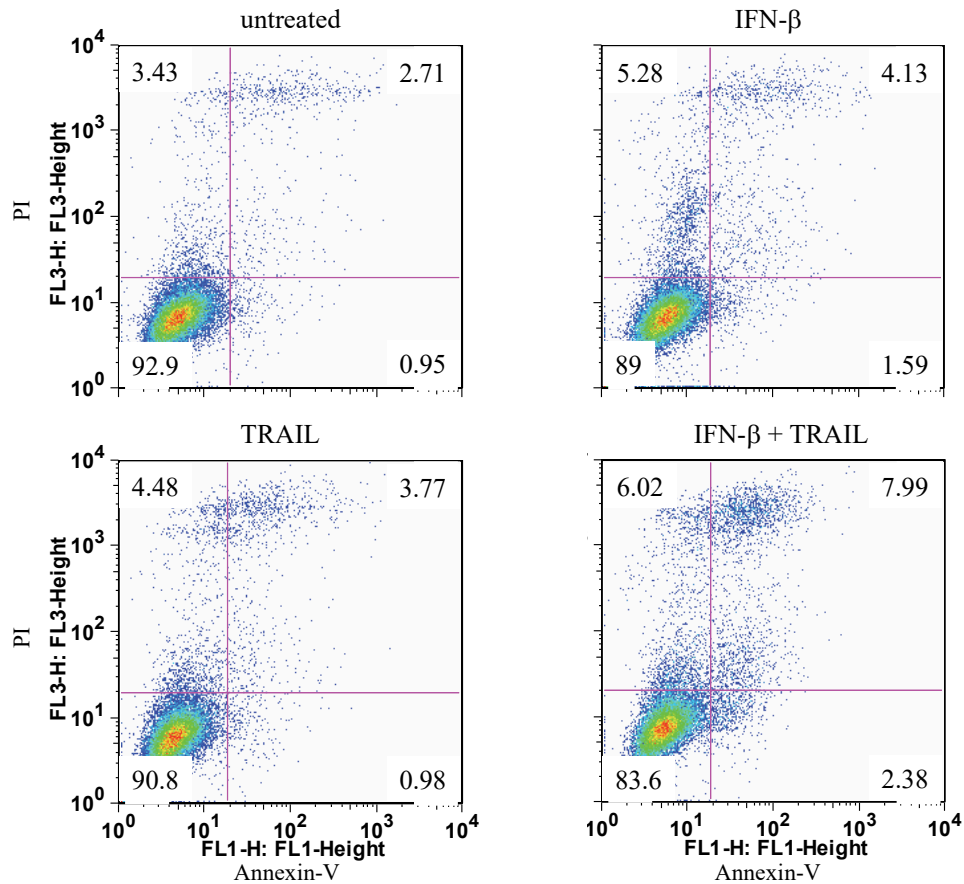
Figure 3. TRAIL、IFN-β併用による細胞増殖抑制効果



7 種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、AM-38、T-98G、U-87MG、U-138MG、U-251MG、YH-13) に、0~1,000 ng/mL の TRAIL および 10 IU/mL の IFN-β を培地に添加し、細胞増殖抑制効果の評価した。A-172、AM-38、T98G、U-138MG、U-251MG において、TRAIL 単独投与と比較し、TRAIL、IFN-β 併用により細胞増殖抑制効果の増強を認めた。一方、U-87MG と YH-13 では TRAIL 単剤群と TRAIL IFN-β 併用群で有意な差を認めなかった。なお、データは平均±SE (標準誤差) として示した。



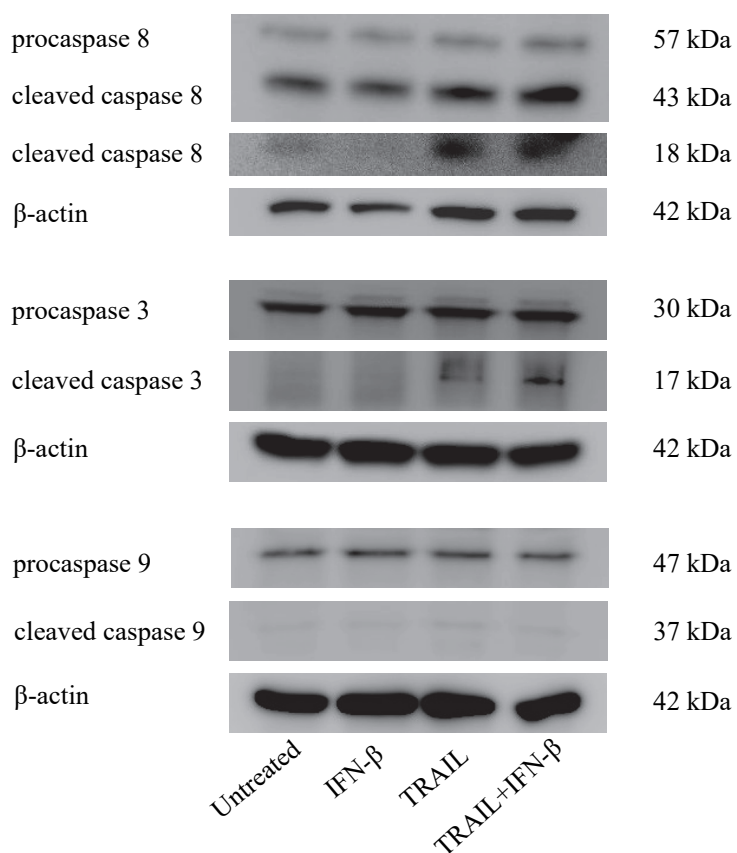
Figure 4. FACS によるアポトーシスの検出



悪性神経膠腫細胞株 U-138MG に対して、TRAIL 1.0 ng/mL 単独、IFN- $\beta$  10 IU/mL 単独、および TRAIL 1.0 ng/mL と IFN- $\beta$  10 IU/mL の併用を行った後、Annexin V および PI に染色される細胞の割合を FACS で評価した。

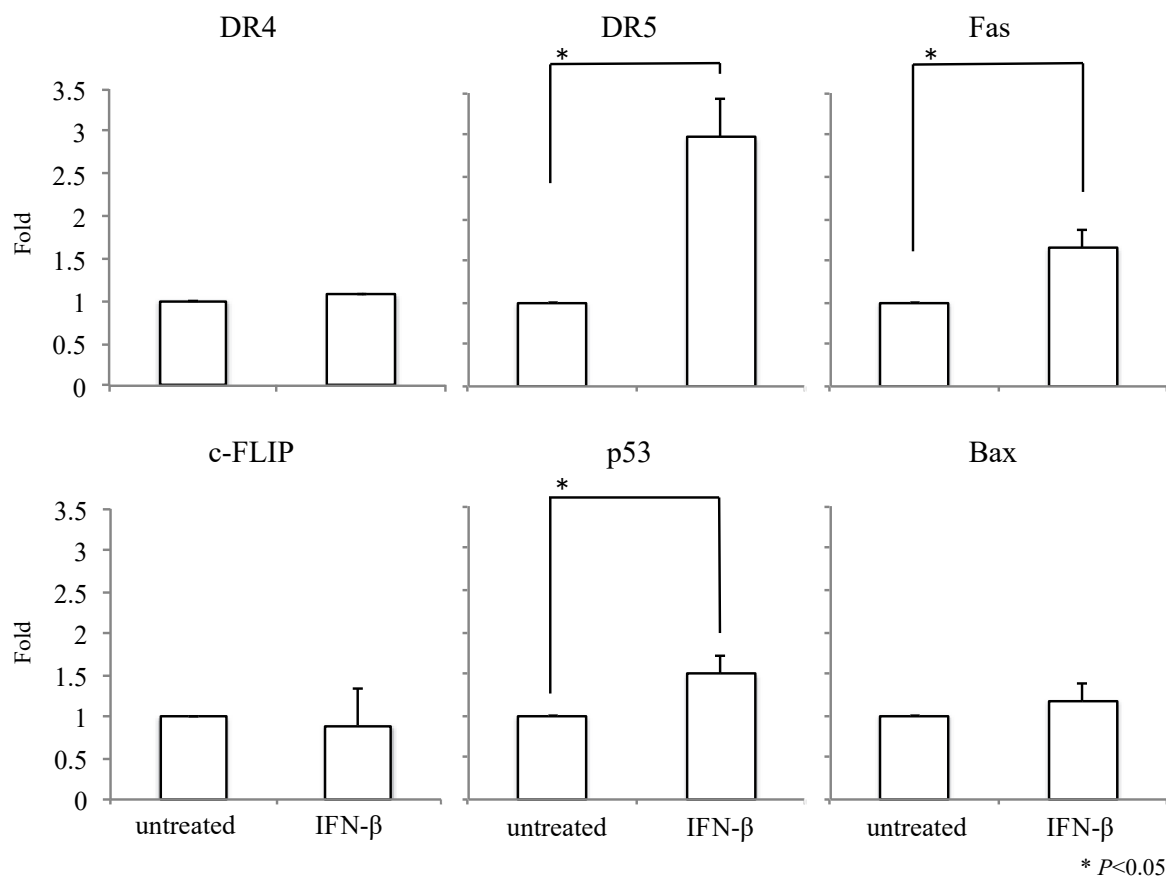
U-138MG において、TRAIL 単独により  $3.65 \pm 1.81\%$  の細胞が、IFN- $\beta$  単独では  $4.29 \pm 1.13\%$  の細胞が Annexin V および PI に陽性であったが、TRAIL と IFN- $\beta$  を併用すると、その割合は  $7.22 \pm 1.68\%$  に増加した。上記図は、ある 1 回の FACS を提示している。

Figure 5. Western blotting による caspase 活性の評価



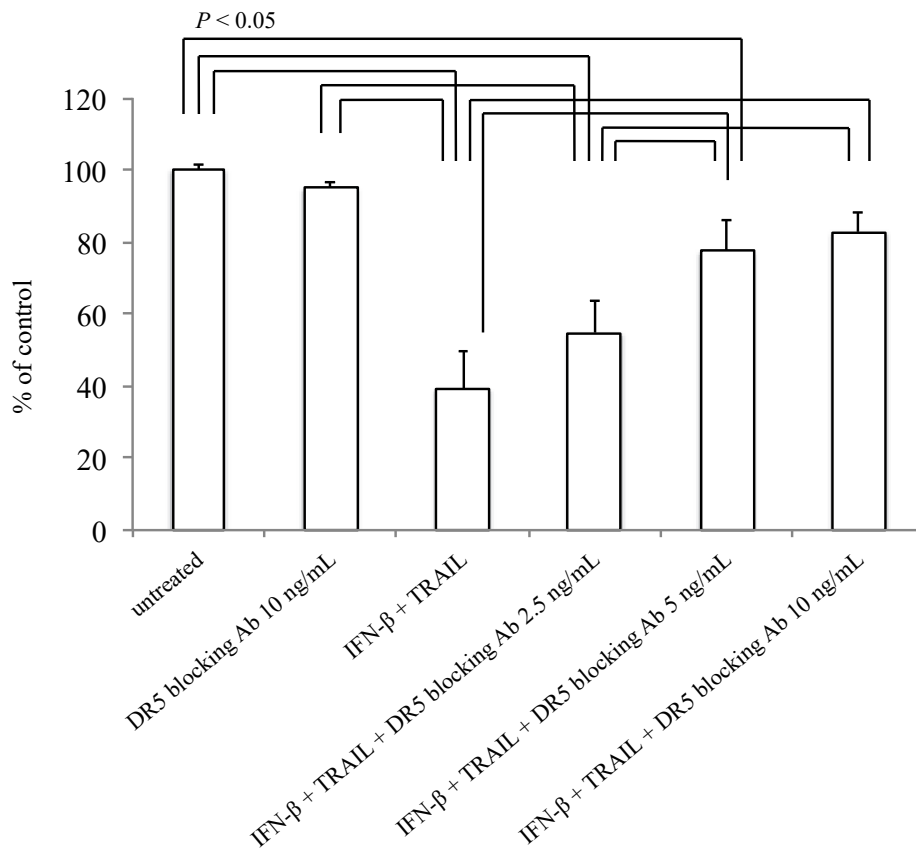
培地に TRAIL 単剤、IFN- $\beta$ 単剤、および TRAIL と IFN- $\beta$ 併用添加 24 時間後における U-138MG の、Caspase 8、Caspase 3、Caspase 9 の発現を Western blotting により解析した。TRAIL、IFN- $\beta$ 併用群において、Caspase 8、Caspase 3 の切断 (cleavage) が見られた。しかし、Caspase 9 に関しては各群間で差を認めなかった。

Figure 6. Real-time qRT-PCR によるアポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現解析



IFN-β添加後のU-138MGにおけるDR4、DR5、Fas、c-FLIP、p53、BaxのmRNA発現をreal-time qRT-PCRにより解析した。IFN-β群において、DR5、Fas、p53の有意な発現亢進を認めた。なおデータは、平均+SE（標準誤差）として示した。

Figure 7. DR5 阻害による細胞増殖実験



悪性神経膠腫細胞株における、TRAIL と IFN-β併用による細胞増殖抑制効果が DR5 の発現に依存することを確認するため、DR5 阻害抗体を用いた実験を行った。DR5 阻害抗体は単独では U138MG 細胞株に有意な影響を与えず、TRAIL と IFN-βの併用は有意な細胞増殖抑制効果を示した。DR5 阻害抗体は、濃度依存的にその細胞増殖抑制効果を有意に減弱させた。図表中のデータは平均+SE (標準誤差) として示した。

## 引用文献

1. Report of brain tumor registry of Japan (1969-1996) , 11th edition. Neurol Med Chir (Tokyo) 43. Supplement, 2003.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. WHO Classification Tumors of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer (IARC) , Lyon, France, 2016.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 352: 987-996, 2005.
4. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al: Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes Dev 15: 1311-1333, 2001.
5. Reardon DA, Omuro A, Brandes A, et al: Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. Neuro-Oncology, 19: iii21, 2017.
6. Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 35: 495-516, 2007.
7. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al: ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. Cell 129: 1337-1349, 2007.
8. Green DR: Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. Cell 102: 1-4, 2000.
9. Fulda S, Debatin KM: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene 25: 4798-4811, 2006.
10. Kischkel, FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) -associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J 14: 5579-5588, 1995.
11. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J 326: 1-16, 1997.
12. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al: Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem 271: 12687-12690, 1996.
13. Walczak H, Miller RE, Arial K, et al: Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related

- apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5: 157-163, 1999.
14. Ashkenazi A, Holland P and Eckhardt SG: Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL) . *J Clin Oncol* 26: 3621-3630, 2008.
  15. Naoum GE, Buchsbaum DJ, Tawadros F, et al: Journey of TRAIL from bench to bedside and its potential role in immuno-oncology. *Oncol Rev* 11: 332, 2017.
  16. von Karstedt S, Montinaro A and Walczak H: Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 17: 352-366, 2017.
  17. Suliman A, Lam A, Datta R, et al: Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and-independent pathways. *Oncogene* 20: 2122-2133, 2001.
  18. Nagane M, Huang HJ and Cavenee WK: The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* 6: 191-197, 2001.
  19. Hawkins CJ: TRAIL and malignant glioma. *Vitam Horm* 67: 427-452, 2004.
  20. Kuijlen JMA, Bremer E, Mooij JJA, et al: Review: On TRAIL for malignant glioma therapy? *Neuropathol and Applied Neurobiol*, 36: 168-182, 2010.
  21. Shang Z and Zhang L: Digitoxin increases sensitivity of glioma stem cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Neurosci Lett* 653: 19-24, 2017.
  22. Khan M, Bi Y, Qazi JI, et al: Evodiamine sensitizes U87 glioblastoma cells to TRAIL via the death receptor pathway. *Mol Med Rep* 11: 257-262, 2015.
  23. Badr CE, Wurdinger T, Nilsson J, et al: Lanatoside C sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and induces an alternative cell death pathway. *Neuro Oncol* 13: 1213-1224, 2011.
  24. Yoon MJ, Kang YJ, Kim EH, et al: Monensin, a polyether ionophore antibiotic, overcomes TRAIL resistance in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, DR5 upregulation and c-FLIP downregulation. *Carcinogenesis* 34: 1918-1928, 2013.

25. Calzolari A, Saille E, De Angelis ML, et al: Salinomycin potentiates the cytotoxic effects of TRAIL on glioblastoma cell lines. *PloS One* 9: e94438, 2014.
26. Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, et al: Treatment of low-grade diffuse astrocytomas by surgery and human fibroblast interferon without radiation therapy. *J Neuro-Oncol* 61: 171-176, 2003.
27. Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, et al: Human interferon beta, nimustine hydrochloride, and radiation therapy in the treatment of newly diagnosed malignant astrocytomas. *J Neuro-Oncol*, 72: 57-62, 2005.
28. Yoshino A, Ogino A, Yachi K, et al: Effect of INF- $\beta$  on human glioma cell lines with temozolomide resistance. *Int J Oncol*, 35: 139-148, 2009.
29. Isaacs A and Lindenmann J: Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147: 258-267, 1957.
30. Vannucchi S, Chiantore MV, Mangino G, et al: Perspectives in biomolecular therapeutic intervention in cancer: from the early to the new strategies with type I interferons. *Curr Med Chem* 14: 667-679, 2007.
31. Borden EC, Sen GC, Uze G, et al: Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6: 975-990, 2007.
32. Bradley NJ, Darling JL, Oktar N, et al: The failure of human leukocyte interferon to influence the growth of human glioma cell populations: in vitro and in vivo studies. *Br J Cancer* 48: 819-825, 1983.
33. Wakabayashi T, Yoshida J, Mizuno M, et al: Effectiveness of Interferon-b, ACNU, and Radiation Therapy in Pediatric Patients with Brainstem Glioma. *Neurol Med Chir* 32, 942-946, 1992.
34. Colman H, Berkey BA, Maor MH, et al: Phase II Radiation Therapy Oncology Group trial of conventional radiation therapy followed by treatment with recombinant interferon- $\beta$  for supratentorial glioblastoma: Results of RTOG 9710. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66: 818-824,

2006.

35. Yoshida J, Kajita Y, Wakabayashi T, et al: Long-term follow-up results of 175 patients with malignant glioma: importance of radical tumour resection and postoperative adjuvant therapy with interferon, ACNU and radiation. *Acta Neurochir* 127: 55-59, 1994.
36. Der SD, Zhou A, Williams BR, et al: Identification of genes differentially regulated by interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci* 95: 15623-15628, 1998.
37. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, et al: Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8: 237-249, 2003.
38. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp* 50: 2597, 2011.
39. Soria JC, Mark Z, Zatloukai P, et al: Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 29: 4442-4451, 2011.
40. Cheah CY, Belada D, Fanale MA, et al: Dulanermin with rituximab in patients with relapsed indolent B-cell lymphoma: an open-label phase 1b/2 randomised study. *Lancet Haematol* 2: e166-e174, 2015.
41. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
42. Pallab R, Deblina G, Juni C, et al: Crocetin exploits p53-induced death domain in (PIDD) and FAS associated death domain (FADD) proteins to induce apoptosis in colorectal cancer. *Scientific Reports* 6: 32979, 2016.
43. Mi JY, You JK, In YK, et al: Monensin, a polyether ionophore antibiotic, overcomes TRAIL resistance in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, DR5 upregulation and c-FLIP downregulation. *Carcinogenesis* 34: 1918-1928, 2013.
44. Edagawa M, Kawauchi J, Hirata M, et al: Role of ATF3 for ER stress-induced sensitization of



- p53-deficient human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis through upregulation of DR5 by zerumbone and celecoxib. *J Biol Chem* 289: 21544-21561, 2014.
45. James K. Earell Jr., Rebecca L. VanOosten and Thomas S. Griffith: Histone deacetylase inhibitors modulate the sensitivity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant bladder tumor cells. *Cancer Research* 66: 499-507, 2006.
46. Junfeng L, Qinglei G, Tao X, et al: Synergistic effect of TRAIL and irradiation in elimination of glioblastoma stem-like cells. *Clin Exp Med* 18:399-411, 2018.
47. Rohn TA, Wagenknecht B, Roth W, et al: CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene* 20, 4128–4137, 2001.
48. Hao C, Beguinot F, Condorelli G, et al: Induction and intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) mediated apoptosis in human malignant glioma cells. *Cancer Res.* 61, 1162–1170, 2001.
49. Xiao C, Yang BF, Asadi N, et al: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 25020–25025, 2002.
50. Ding L, Yuan C, Wei F, et al: Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-FLIP. *Cancer Investigation*, 29, 511-520, 2011.
51. Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3rd, et al: KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature genetics* 17: 141-143, 1997.
52. Huang Y, Yang X, Xu T, et al: Overcoming resistance to TRAIL-induced apoptosis in solid tumor cells by simultaneously targeting death receptors, c-FLIP and IAPs. *Int J Oncol* 49: 153-163, 2016.

53. Min KJ, Um HJ, Seo SU, et al: Angelicin potentiates TRAIL-induced apoptosis in renal carcinoma Caki cells through activation of caspase 3 and down-regulation of c-FLIP expression. *Drug Dev Res* 79: 3-10, 2018.
54. Lemke J, von Karstedt S, Abd El Hay M, et al: Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1. *Cell Death Differ* 21: 491-502, 2014.
55. Woo SM, Min KJ, Seo BR, et al: YM155 sensitizes TRAIL-induced apoptosis through cathepsin S-dependent down-regulation of Mcl-1 and NF- $\kappa$ B-mediated down-regulation of c-FLIP expression in human renal carcinoma Caki cells. *Oncotarget* 7: 61520-61532, 2016.
56. Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195, 1997.

## 研 究 業 績

吉村相大

I	発表	①一般発表	3		
		②特別発表	なし		
II	論文	①原著論文	1 (共	1)	
		②症例報告	1 (単	1 / 共	4)
		③総説	なし		
III	著書		なし		

以上

I 発表

①一般発表

1. 李相大, 後藤公聖, 山室俊, 太田隆, 茂呂修啓, 小林一太, 吉野篤緒: くも膜嚢胞との鑑別が困難であったラトケ嚢胞に内視鏡下経蝶形骨洞手術を施行した一例, 第128回日本脳神経外科学会関東支部学術集会, 東京, 2015年12月
2. 李相大, 花島裕也, 榎田浩太郎, 山室俊, 落合祐之, 太田隆, 吉野篤緒: 肺、肝臓に転移を来した Anaplastic meningioma の一例, 第51回ニューロ・オンコロジーの会, 東京, 2016年8月
3. 李相大, 影山悠, 栗原淳: 長期生存を得た ETANTR(ETMR)の一例, 第34回日本こども病院神経外科医会, 札幌, 2016年12月

II 論文

①原著論文

1. Ochiai Y, Sano E, Okamoto Y, Yoshimura S, Makita K, Yamamuro S, Ohta T, Ogino A, Tadakuma H, Ueda T, Nakayama T, Hara H, Yoshino A & Katayama Y : Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines: Follow-up study, *Oncology reports*, 39, 537-544, 2018.

②症例報告

1. Yamamuro S, Hanashima Y, Yoshimura S, Aoki H, Kamiya K, Takamine Y, Negishi T & Yoshino A : Glioblastoma fed by middle meningeal artery and displaying cyst formation soon after repeated implantation of carmustine wafers: A case report, *Molecular and clinical oncology*, 7, 953-956. 2017.
2. Yamamuro S, Yoshimura S, Oshima H & Yoshino A : A case of Rathke cleft cyst concomitant with sellar/suprasellar arachnoid cyst, *Acta Neurologica Belgica*, 117, 561-563, 2017.
3. Yamamuro S, Homma T, Hanashima Y, Yoshimura S, Oshima H, Ohni S, Kusumi Y & Yoshino A : A case of symptomatic granular cell tumor of the sellar region with large calcification, *Neuropathology*, 37, 371-374, 2017.
4. Makita K, Ohta T, Yamamuro S, Yoshimura S, Ochiai Y, Sumi K, Yoshino A, Homma T & Sugitani M : Case Report Gene alteration of rosette-forming glioneuronal tumor in a suprasellar lesion, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9, 6873-6881, 2016.

5. Yoshimura S, Ohta T, Makita K, Yamamuro S, Ochai Y, Sumi K, Shijo K , Yoshino A, Homma T, Sugitani M & Yuzawa S, Nishihara H, Tanaka S, Case Report EXO1 homozygous deletion suppresses the hydroxyurea sensitivity in anaplastic meningioma with extracranial metastases, International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 9, 18618-18625, 2016.