



Intracellular cholesterol level regulates sensitivity of glioblastoma cells against temozolomide-induced cell death by modulation of caspase-8 activation via death receptor 5-accumulation and activation in the plasma membrane lipid raft

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-05-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 祐太郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3340

博士(医学) 山本 祐太朗

論文題目

Intracellular cholesterol level regulates sensitivity of glioblastoma cells against temozolomide-induced cell death by modulation of caspase-8 activation via death receptor 5-accumulation and activation in the plasma membrane lipid raft

(細胞内コレステロールレベルは、細胞膜上脂質ラフトにおけるデスレセプター5 の集積および活性化を介するカスパーゼ 8 活性の調節により、膠芽腫細胞のテモゾロミド誘発性細胞死の感受性を制御する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

膠芽腫 (GBM) におけるテモゾロミド (TMZ) 長期投与後の抵抗性獲得は、臨床的な GBM 治療において非常に重要な問題の 1 つである。一方、細胞内コレステロールは、がん細胞の biology を制御することが既に知られているが、細胞内コレステロールと GBM 細胞の TMZ 抵抗性獲得との関係は未だはっきりわかっていない。そこで本研究は、GBM 細胞における TMZ 誘発性細胞死と細胞内コレステロールの関係について検討を行った。

[材料ならびに方法]

ヒト GBM 培養細胞株 U251MG 細胞ならびに U373MG 細胞を TMZ 投与下で 9 ヶ月間培養し、各細胞の TMZ 抵抗性獲得株を作成した。細胞生存率は dye-exclusion 法にて定量を行った。細胞内コレステロール量の可視化ならびに定量は、Filipin iii による細胞染色および市販のコレステロール定量キットで行った。細胞ライセートを精製して各種タンパク質の発現をウエスタンブロット法で解析した。細胞ライセートの脂質ラフト/非ラフト分画の精製に Triton X-100 を、細胞膜成分の精製に市販の細胞膜分画精製キットを使用した。精製した細胞膜タンパク質はデスレセプター5 (DR5) 抗体で免疫沈降を行い、ウエスタンブロットにて DR5 結合分子の解析を行った。DR5 のノックダウンは siRNA にて行った。

[結果]

細胞内コレステロール量はヒト GBM 培養細胞株 U251MG 細胞の TMZ 抵抗性獲得株 (U251-R 細胞) において TMZ 感受性株 (U251-Con 細胞) と比べ有意に低下していた。この結果から細胞内コレステロール量は GBM 細胞の TMZ 抵抗性の制御に重要と考え、次に、細胞内コレステロール除去剤のメチルベータシクロデキストリン (M β CD) や細胞内コレステロール導入剤の可溶性コレステロール (Chol) を用いて検討をしたところ、これらの薬剤処理は細胞内コレステロール量の変動に一致して U251-Con 細胞の TMZ 依存性細胞死を制御した。続いて、細胞内コレステロール濃度によって活性が制御されることが知られている細胞膜の DR5 の関与について検討を行ったところ、TMZ、M β CD、Chol 処理により DR5 は細胞膜の脂質ラフトへ集積し、カスパーゼ 8 と

の複合体を形成した。また、カスパーゼ 8 阻害剤処理や DR5 をノックダウンすることにより、TMZ、MβCD、Chol 併用による U251-Con 細胞死は優位に抑制された。さらに、TMZ と Chol の併用では U251-R 細胞やその他の GBM 細胞の TMZ と耐性株で TMZ 抵抗性が解除された一方で、抗高脂血症薬の臨床的濃度下での併用においては、むしろ U251-Con 細胞の TMZ 誘発性細胞死が抑制された。

[考察]

今回の我々の実験結果から、GBM 細胞内コレステロール量の低下が GBM 細胞の TMZ 抵抗性を促進する可能性が示唆された。高濃度の抗高脂血症薬が GBM 細胞における TMZ の毒性を増強することは既に報告されているが、本研究では臨床治療で用いられる過去の報告に比べ低い濃度の抗高脂血症薬を使用している。従って、今回の結果より、抗高脂血症薬治療の影響により、むしろ GBM 細胞が TMZ に対する抵抗性を獲得し易くなる可能性が示唆された。

本研究から、GBM 細胞の TMZ 曝露が DR5 の脂質ラフトへの蓄積と下流の外因性カスパーゼ経路の活性化の引き金となり、Chol による細胞内コレステロール量の増加はそのメカニズムを増強することが明らかとなった。高濃度の TMZ は小胞体ストレスを引き起こすことが既に報告されており、小胞体ストレスはリガンド非依存的な DR5 の活性化を介した細胞死を起こすことが報告されているため、TMZ と Chol の併用は DNA 損傷応答に関わる p53 のような遺伝子の変異を有したグリオーマに対して画期的な治療になりうる可能性が示唆された。

以上より、本研究の結果から細胞内コレステロール制御は TMZ 抵抗性を獲得した GBM の新たな治療標的となる一方で、高脂血症治療のために HBG-CoA 還元酵素阻害剤を使用している GBM 患者では、むしろ TMZ 治療が不良となる可能性もあることが示唆された。

[結論]

細胞内コレステロールレベルは DR5-カスパーゼ 8 系を介して GBM の TMZ 治療に影響を与えると考えられた。