

201307049B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

アジア人種型 2 型糖尿病の治療法及び治療薬の開発を可能にする  
マウス及びヒト膵  $\beta$  細胞由来のモデル細胞系の構築

平成24年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 魏 范研

平成 26 (2014) 年 5 月

# 目 次

I. 総合研究報告	
アジア人種型 2 型糖尿病の治療法及び治療薬 の開発を可能にするマウス及びヒト膵 $\beta$ 細胞 由来のモデル細胞系の構築 魏 范研	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 9
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 11



アジア人種型 2 型糖尿病の治療法及び治療薬の開発を可能にする

マウス及びヒト膵  $\beta$  細胞由来のモデル細胞系の構築

研究代表者 魏 范研 熊本大学 助教

研究要旨

アジア型 2 型糖尿病は、非肥満及び低インスリン分泌といった特徴を持ち、欧米型 2 型糖尿病とは異なる病態を示す。一方、既存の糖尿病治療薬は、特にアジア人種において高頻度の副作用が報告されている。従って、アジア人種に適した新規治療薬及び治療法の開発が必要である。しかし、アジア型 2 型糖尿病の発症原因が不明であったため、治療薬の開発及び評価が不可能であった。

Cdkal1 遺伝子の一塩基多型変異(SNPs)は、アジア人種において約四人に一人という高い頻度で保有されており、アジア型 2 型糖尿病の原因遺伝子の一つである。Cdkal1 は、リジン tRNA をチオメチル化し、リジンコドンの正確な翻訳に必要であった。また、Cdkal1 の膵臓  $\beta$  細胞欠損マウス(Cdkal1 KO)マウスでは、プロインスリンのリジンコドンにおける誤翻訳が原因となり、低インスリン分泌及び非肥満といったアジア型 2 型糖尿病に類似した表現型を呈した。さらに、2 型糖尿病発症と相関する危険型 Cdkal1 SNPs を有する人において Cdkal1 の特異的な転写産物の発現量が低下し、Cdkal1 活性が低下していた。以上のことから、Cdkal1 遺伝子変異を伴うアジア型 2 型糖尿病の発症は、Cdkal1 活性低下による tRNA 修飾異常ならびにリジンコドンの誤翻訳に起因すると明らかになった。

本研究では、Cdkal1 KO マウス由来の Cdkal1 欠損膵  $\beta$  細胞株、また、危険型 Cdkal1 SNPs を有するヒト Fibroblast 由来の iPS 細胞から分化誘導したヒト膵  $\beta$  細胞を利用して、アジア型 2 型糖尿病の特徴を有する細胞評価系を構築することを目的とする（24 年度）。また、既存の治療薬や独自の低分子化合物ライブラリーを利用し、Cdkal1 遺伝子変異に伴うアジア型 2 型糖尿病治療薬の評価及び新規開発にも着手する（25 年度）。

本研究成果により、世界初の Cdkal1 遺伝子変異に起因するアジア型 2 型糖尿病の特徴を有するマウス及びヒト膵  $\beta$  細胞のモデル系の確立が期待され、Cdkal1 遺伝子変異を有する 2 型糖尿病に対する最適な治療薬及び治療法を確立することが可能となる。

国立大学法人 熊本大学  
大学院生命科学研究部 助教  
魏 范研

## A. 研究目的

日本における2型糖尿病患者は、その予備軍も含めると現在1,370万人と推定されており（厚生労働省実態調査より）、年々患者数は増加している。また近年中国やインドでも経済の発展に伴い、患者数が激増しており、アジア地域における糖尿病の治療法の確立は社会的な要請が高い。

2型糖尿病に対する治療薬は、既に多く開発され、広く一般使用されている。しかし、これらの治療薬は人種間の体質差及び病態差を考慮に入れて開発されたものではない。そのため、同様な治療薬を用いても、日本における重症低血糖発見率は米国食品医薬品局データベースのデータに比べて1,000倍以上と高率である（Medical Tribune, Vol. 44. No. 47）。この事実が示すように、現在の治療薬や治療法は、必ずしも日本人を含むアジア人種にとって最適なものではない。従って、アジア人種に適した治療法や新規治療薬の開発が必要である。しかし、なぜ欧米人種とアジア人種に2型糖尿病の病態差が生じるか、その分子機構は不明であったため、アジア型2型糖尿病に対する治療法や新規治療薬を開発するための基盤が存在しなかった。

我々は世界に先駆けてCdkal1の分子機能を明らかにし、アジア2型糖尿病発症の分子機構の一端を明らかにした。そこで、我々独自の研究成果

に基づき、本研究においてアジア型2型糖尿病に対する治療法及び治療薬の開発を可能にするマウス及びヒト膵β細胞由来のモデル細胞系の構築を目的とし、研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. 誤翻訳検出用レポーターウィルスの作製

Firefly ルシフェラーゼの529番のリジンは、ルシフェラーゼの活性に非常に重要であるため、そのリジンコドンが他のアミノ酸コドンに改変されると、ルシフェラーゼ活性はほぼ消失する。即ち、Firefly ルシフェラーゼ活性は、529番のリジンの翻訳精度に強く依存する。一方、Renilla ルシフェラーゼ活性はリジンに依存しない。本研究では、Firefly ルシフェラーゼとRenilla ルシフェラーゼを連結させたレポーターを含むレンチウィルスをまず作製する。

### 2. レポーターを含むCdkal1 KOβ細胞由来のスクリーニング系の構築

誤翻訳を検出するレポーターを含むウィルスをCdkal1 KO β細胞株に導入した後、96-well プレートにβ細胞株を生着させる。90%以上の生存率でマルチウェルに生着することを目標とする。なお、Cdkal1 遺伝子欠損β細胞株は、我々が現有するCdkal1 KO マウス（特願 2009-258382）の膵β細胞をSV40 Large T 抗原の導入によって不死化させたものである。ルシフェラーゼ活性は、細胞を融解させた後、ATPによる発光効果を利用した

市販のキットを用いて測定する。

### 3. Fibroblast から iPS 細胞の誘導

健常人 Fibroblast における Cdkal1 遺伝子型を PCR により同定した後、危険型 Cdkal1 SNPs 並びに非危険型 Cdkal1 SNPs を有する Fibroblast に、SOX2、Klf4、Oct3/4、c-Myc を導入し、iPS 細胞を作製する。

### 2. iPS 細胞から $\beta$ 細胞への誘導

iPS 細胞から  $\beta$  細胞への誘導は、我々が独自に開発し、特許出願した関連技術を用いる（特願 2011-071530）。本技術は特殊なコーティング剤を用いて高効率で iPS から膵  $\beta$  細胞に誘導できるものである。本研究では、この技術を応用して、PDX-1、NeuroD、MafA タンパクを iPS 細胞に導入することにより膵  $\beta$  細胞を作製する。誘導結果は、インスリン遺伝子の発現量をリアルタイム PCR によって測定し、検討する。なお、PDX-1、NeuroD 及び MafA タンパクを細胞に導入する際、我々の研究グループが持つタンパク導入法技術を利用する（PCT / JP2003 / 012816 (W02004/032955)）。

### 4. 低分子化合物による一次スクリーニング

作製した翻訳精度を検出するモデル細胞に既存の糖尿治療薬或は低分子化合物ライブラリーを加えた後、細胞を融解し、Dual Luciferase Reporter System (Promega)を用いた Firefly ルシフェラーゼ及び Renilla ルシフェラーゼ活性を測定することにより、治療薬あるいは低分子化合物の誤翻訳改善効果を評価する。抗糖尿病薬

は、スルフォニル尿素系薬（グリベンクラミド）、GLP-1 に対する治療薬（Exendin-4 や DPP4 阻害剤）、ビグアナイド系薬（メトホルミン）を予定している。低分子化合物ライブラリーはすでに現有するものを用いる。

### 5. 二次スクリーニング

次に、低グルコース培地で培養中の同細胞アレイに一次陽性化合物を加え、15分後に化合物を含む高グルコース培地を置換して刺激する。インスリンが分泌されるには細胞内カルシウム濃度の上昇が重要であるため、刺激時の培地中に分泌されるインスリンの量または細胞内カルシウムの上昇を測定する。化合物を加えない細胞を対照とし、化合物を加えた細胞においてインスリン分泌量またはカルシウム濃度が2倍以上に上昇した化合物を二次陽性化合物とする。

### 6. In vivo による耐糖能及び翻訳改善効果の検討

二次陽性化合物の in vivo における効果を検討するために、陽性化合物を 1mg/kg の用量で Cdkal1 欠損マウスに経腹投与する。最後の投与から36時間後に糖負荷試験を行う。具体的には、1 g/kg の用量でブドウ糖液を腹腔に注射し、15分ごとに尾静脈から採血し、血糖値を測定する。また、翻訳改善効果を検討するために、化合物投与後に Cdkal1 欠損マウスからランゲルハンス島を精製し、Total RNA を抽出する。その後、誤翻訳の指

<p>後、誤翻訳の指標である小胞体ストレス遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により検討する。</p> <p>7. 新規化合物の創出</p> <p>本研究によって得られた陽性化合物群は、翻訳の精度を改善することでインスリン分泌を向上させ、膵島の機能を回復させると考えられる。翻訳改善の効果を最大化させるために、陽性化合物群に共通する骨格を見出し、化合物の最適化を図り、独自の化合物リソースの確保を行う。</p> <p>（倫理面への配慮）</p> <p>本研究は、患者もしくは患者からの得られたサンプルを使用するような臨床研究、臨床疫学研究では無い。本研究で計画されているヒト細胞での遺伝子解析研究はすでに学内倫理委員会によって承認されている（ゲノム第159号）。</p> <p>組換え DNA 実験は、本大学の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全委員会の承認を受けた後、使用する微生物のレベルに応じた実験室で行なう。また、研究開発の過程で使用する遺伝子組み換え生物（ウイルス等）はすべて倫理委員会から承認されている（承認番号 21-075）。</p> <p>ヒト iPS 細胞の使用に関しては、「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」を遵守し、本大学のヒト ES 細胞研究倫理委員会の承認を受けた後、研究を実施する。</p> <p>C. 研究結果</p> <p>1. 誤翻訳を検出するルシフェラーゼを用いたレポーターをレンチウイルスに組み込み、HEK293</p>	<p>細胞にて大量にウイルスを作製した。次に、Cdkal1 KO マウスと SV40 を発現するトランスジェニックマウスを交配させることにより得られた Cdkal1 を欠損した不死化膵β細胞に、レポーターを含むレンチウイルスを導入した。その後、β細胞を96ウェルプレートに生着させ、細胞アレイを作製した。細胞の生着率は90%以上に達したことを確認した後、ルシフェラーゼ検出試薬を用いて、Renilla luciferase 及び Firefly luciferase の発光強度を測定した。その結果、Firefly luciferase の発光強度は 312115 カウント、Renilla luciferase の発光強度は 657488 カウントと測定可能範囲内の発光強度を得ることが出来た。</p> <p>2. PCR 法により遺伝子型を確かめられた危険型 Cdkal1 SNPs を有するヒト Fibroblast に SOX2、Klf4、Oct3/4、c-Myc を有するセンダイウイルスを導入し、iPS 細胞を作製した。その後、iPS 細胞を 804G 細胞の分泌液をコーティングしたプレートに生着させ、細胞透過ドメインを有する PDX-1、NeuroD、MafA タンパクを直接 iPS 細胞に加えた。誘導後 17 日目に、定量 PCR 法により内在性 pdx1 やインスリン遺伝子の発現を検出した。</p> <p>3. Cdkal1 KO マウス由来の細胞アレイ（①において実施済み）に低分子化合物を加え、翻訳精度によるスクリーニングを行った。その結果 17 種類の化合物において翻訳精度の</p>
--	---

向上効果が見られた。さらにこれらの化合物を細胞内カルシウム及び培養上清中のインスリン分泌量で二次スクリーニングを行った結果、8種類の化合物が陽性反応を示した。

#### 4. 既存糖尿病治療薬によるスクリーニング

平成24年度において *Cdkal1* KO マウス由来の *Cdkal1* 欠損膵β細胞株からなる細胞評価系の構築に成功したので、本年度において既存の糖尿病治療薬が *Cdkal1* 欠損に由来する誤翻訳に対して効果を有するかを検討するために、糖尿病治療薬を細胞評価系に投与し、誤翻訳率を検討した。具体的には、用いた治療薬は現在もっとも頻繁に使用されているスルフォニル尿素剤、メトホルミン、グルコシダーゼ阻害剤、インクレチン分解阻害剤を最終濃度 10μM になるように培地に添加した後、ルシフェラーゼの活性を測定し、誤翻訳の改善効果を検討した。しかし、いずれの治療薬も *Cdkal1* 欠損による誤翻訳に対して効果を示さなかった。

#### 5. 低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

既存の糖尿病治療薬が誤翻訳に対して効果を示さなかったことから、新たな薬剤の探索を目指して2000種類の低分子化合物ライブラリーを最終濃度 10μM になるように同細胞評価系に投与し、翻訳改善効果を有する化合物の探索を行った。その結果、平均改善効果が溶媒のみを投与した対照群と比較して2倍以上を有する化合物を45種類得ることができた。さらに、45種類の

化合物がインスリン分泌に対しても効果を有するかを検討するために、単離膵島に化合物を投与しインスリン分泌促進効果を検討した。その結果、15種類の化合物についてインスリン分泌促進効果が見られた。

#### 6. in vivo スクリーニング

細胞評価系によるスクリーニング計画が予定より早く実施できたため、新規化合物の臨床応用を目指し、化合物の翻訳改善効果が見られた化合物の動物におけるインスリン分泌改善効果並びに翻訳改善効果を検討した。まず、誤翻訳改善及びインスリン分泌促進効果の高さ、さらに既存化合物との類似性といった三つの判断基準で45種類の二次陽性化合物から二種類選定し、in vivo における耐糖能改善効果を検討した。二種類の化合物を1mg/kgの用量で *Cdkal1* KO マウスに1週間にわたり連日投与を行った。一方、溶媒のみを投与した *Cdkal1* KO マウスを対照群とした。最後の投薬から36時間以上経過した時点で、耐糖能変化を評価するために糖負荷試験を行った。具体的には、前晩から絶食させたマウスにブドウ糖液を1g/kgの用量でマウスに経腹投与し、投与後15分おきに尾静脈より採血し、血糖値の変化を計測した。その結果、二種類化合物は *Cdkal1* KO マウスの血糖値を有意に改善することができた。

一方、本スクリーニング系によって得られた化合物は、翻訳を改善する効果を持つと期待される。そのため、化合物投与による *Cdkal1* KO マウスの耐糖能の改善は、誤翻訳の改善によるもの

と考えられる。その仮説を検討するために、化合物投与群及び対照群のマウスから膵β細胞を単離し、誤翻訳の指標である小胞体ストレス遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により検討したところ、小胞体ストレス遺伝子の発現量が対照群と比較して有意に低下した。

#### 7. 新規リード化合物の開発

ライブラリーのスクリーニングによって得られた45種類の化合物の誤翻訳改善効果をさらに改良するために、これらの化合物に共通する構造をもとに、新たな化学修飾を加えた新規化合物種を60種類合成した。また、同60種類の化合物を最終濃度 10μM になるように細胞評価系に投与し、誤翻訳改善効果を検討した。また、対照として以前のスクリーニングで得られた化合物を用いた。その結果5種類の陽性化合物が得られた。

#### D. 考察

1. 以上の結果から、本研究の申請時における研究目的の一つであるマウス由来のスクリーニング系の構築を達成したと考える。また、危険型 SNP を有するヒト繊維芽細胞から膵β細胞の分化誘導にも成功した。

2. 本研究で開発した誤翻訳を検出する細胞評価系に既存の糖尿病治療薬を投与し検討した結果、誤翻訳を改善する効果が見られなかった。このことは、これまでの治療薬は受容体の活性化を介してインスリン分泌を促進することにより症状を

改善するものであり、誤翻訳に対しては効果を示さないことを示唆する。従って、Cdkal1 遺伝子に変異を持つ2型糖尿病患者に対しては、その症状を根本的に改善するために全く新しいアプローチが必要であると考ええる。

3. 本研究で開発したモデル細胞及び Cdkal1 KO マウスを用いたスクリーニングにより、Cdkal1 欠損による耐糖能異常に対して効果的な化合物が二種類得られた。得られた化合物は *in vivo* においても翻訳精度を改善できたことから、開発した細胞評価系の有効性が示されたのみならず、得られた化合物は Cdkal1 欠損による2型糖尿病に対して新規治療薬となる可能性が示唆された。興味深いことに、今回得られた化合物は他の疾患に対して長く使用されている治療薬であった。これらの治療薬のヒトにおける安全性はすでに確かめられているため、2型糖尿病への臨床適用に向けて迅速に進めることが可能である。これらの結果を踏まえ、我々は、今回発見した化合物を特許出願し、臨床試験の開始に向けて準備を進めている。

4. 今回スクリーニングでは45種類の化合物が翻訳精度改善効果を示した。興味深いことにこれらの化合物に共通する化学構造が見出された。このことは、本細胞評価系の妥当性を示唆するものであると同時に、同化学構造を基にさらに改変を行えば、いままでにない斬新な2型糖尿病薬の開発が期待される。



## E. 結論

平成24年度から研究においてアジア型糖尿病の原因遺伝子及びその表現型を持つ Cdkal1 欠損細胞スクリーニング系を構築した。また、同スクリーニング系を用いてスクリーニングを行った結果、翻訳精度を向上させながら、インスリン分泌を促進する低分子化合物の発見に至った。さらに、同低分化合物は Cdkal1 KO マウスにおいて小胞体ストレスを低下させ、耐糖能を改善した。従って、本研究は、Cdkal1 遺伝子変異に起因するアジア型2型糖尿病の特徴を有するモデル細胞を確立し、Cdkal1 遺伝子変異を有する2型糖尿病に対する最適な治療薬の候補を同定した。

## F. 健康危険情報

本開発においてウィルスなどを用いたが、健康に危険を及ぼすことはなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Ueda Y, Wei FY, Hide T, Michiue H, Takayama K, Kaitsuka T, Nakamura H, Makino K, Kuratsu J, Futaki S, Tomizawa K. Induction of autophagic cell death of glioma-initiating cells by cell-penetrating D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus. *Biomaterials*. 2012 Dec;33(35):9061-9.

(2) Sato Y, Hatta M, Karim MF, Sawa T, Wei

FY, Sato S, Magnuson MA, Gonzalez FJ, Tomizawa K, Akaike T, Yoshizawa T, Yamagata K. Anks4b, a novel target of HNF4α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β-cells. *J Biol Chem*. 2012 Jun 29;287(27):23236-45.

(3) Okimoto N, Bosch OJ, Slattery DA, Pflaum K, Matsushita H, Wei FY, Ohmori M, Nishiki T, Ohmori I, Hiramatsu Y, Matsui H, Neumann ID, Tomizawa K. RGS2 mediates the anxiolytic effect of oxytocin. *Brain Res*. 2012 May 9;1453:26-33.

(4) Zhou B, Wei FY, Kanai N, Fujimura A, Kaitsuka T, Tomizawa K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human.

(5) Hakim F, Kaitsuka T, Raeed JM, Wei FY, Shiraki N, Akagi T, Yokota T, Kume S, Tomizawa K. High Oxygen Condition Facilitates the Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cells into Pancreatic Progenitors and Insulin-producing Cells. *J Biol Chem*. 2014 Apr 4;289(14):9623-38.

<p>(6) Fujimura A, Michiue H, Cheng Y, Uneda A, Tani Y, Nishiki T, Ichikawa T, <u>Wei FY</u>, Tomizawa K, Matsui H. Cyclin G2 promotes hypoxia-driven local invasion of glioblastoma by orchestrating cytoskeletal dynamics. Neoplasia. 2013 Nov;15(11):1272-81.</p>	<p>翻訳精度維持における tRNA 修飾の役割及びその破綻による病態の解析（口頭発表）</p> <p>(2) 第91回日本生理学会、鹿児島 Cdkal1 欠損マウスにおける抗糖尿病治療薬効果の検討（ポスター発表）</p>
<p>(7) Kaitsuka T, Noguchi H, Shiraki N, Kubo T, <u>Wei FY</u>, Hakim F, Kume S, Tomizawa K. Generation of functional insulin-producing cells from mouse embryonic stem cells through 804G cell-derived extracellular matrix and protein transduction of transcription factors. Stem Cells Transl Med. 2014 Jan;3(1):114-27.</p>	<p>(3) 第91回日本生理学会、鹿児島 チオメチル化修飾欠損によるタンパク質誤翻訳への効果的な化合物のスクリーニング系の開発（ポスター発表）</p> <p>H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）</p> <p>1. 特許取得（出願）</p>
<p>(8) Xie P, <u>Wei FY</u>, Hirata S, Kaitsuka T, Suzuki T, Suzuki T, Tomizawa K. Quantitative PCR measurement of tRNA<sup>2</sup>-methylthio modification for assessing type 2 diabetes risk. Clin Chem. 2013 Nov;59(11):1604-12.2.</p>	<p>(1) 特願 2013- 47278 出願日：平成25年3月8日 発明名称：RNA修飾の簡易検出法、及び該検出法を用いた2型糖尿病の検査方法</p>
<p>(9) Gotanda Y, <u>Wei FY</u>, Harada H, Nakamura KI, Ohta K, Tomizawa K, Ushijima K. Efficient transduction of eleven poly-arginine peptide in an ischemic lesion of mouse brain. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2014. In press</p>	<p>(2) 特願 2013- 072391 出願日：平成25年3月29日 PCT 出願：平成26年3月28日 発明名称：2型糖尿病治療剤</p>
<p>2. 学会発表</p> <p>(1) 第90回日本生理学会、東京</p>	

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ueda Y, <u>Wei FY</u> , Hida T, Michiue H, Takayama K, Kaitsuka T, Nakamura H, Makino K, Kuratsu J, Futaki S, Tomizawa K.	D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus.	Biomaterials.	33	9061-9069.	2012
Sato Y, Hatta M, Karim MF, Sawa T, <u>Wei FY</u> , Sato S, Magnusson MA, Gonzalez FJ, Tomizawa K, Akaike T, Yoshizawa T, Yamagata K.	Anks4b, a novel target of HNF4α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β-cells.	J Biol Chem.	287	23236-23245	2012
Okimoto N, Bosch OJ, Slattery DA, Pflaum K, Matsushita H, <u>Wei FY</u> , Ohmori M, Nishiki T, Ohmori I, Hiramatsu Y, Matsui H, Neumann ID, Tomizawa K.	RGS2 mediates the anxiolytic effect of oxytocin.	Brain Res.	1453	26-33	2012
Zhou B, <u>Wei FY</u> , Kanai N, Fujimura A, Kaitsuka T, Tomizawa K.	Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human.	Hum Mol Genet..			2014
Hakim F, Kaitsuka T, Raeed JM, <u>Wei FY</u> , Shiraki N, Akagi T, Yokota T, Kume S, Tomizawa K.	High Oxygen Condition Facilitates the Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cells into Pancreatic Progenitors and Insulin-producing Cells.	J Biol Chem.	289	9623-9638	2014

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujimura A, Michiue H, Cheng Y, Uneda A, Tani Y, Nishiki T, Ichikawa T, <u>Wei FY</u> , Tomizawa K, Matsui H.	Cyclin G2 promotes hypoxia-driven local invasion of glioblastoma by orchestrating cytoskeletal dynamics. Neoplasia.	Neoplasia.	15	1272-1281	2013
Kaitsuka T, Noguchi H, Shiraki N, Kubo T, <u>Wei FY</u> , Hakim F, Kume S, Tomizawa K.	Generation of functional insulin-producing cells from mouse embryonic stem cells through 804G cell-derived extracellular matrix and protein transduction of transcription factors.	Stem Cells Transl Med.	3	1604-1612	2014
Xie P, <u>Wei FY</u> , Hirata S, Kaitsuka T, Suzuki T, Tomizawa K.	Quantitative PCR measurement of tRNA <sup>2</sup> -methylation modification for assessing type 2 diabetes risk.	Clin Chem.	59	23236-23245	2013
Gotanda Y, <u>Wei FY</u> , Harada H, Nakamura KI, Ohta K, Tomizawa K, Ushijima K.	Efficient transduction of eleven poly-arginine peptide in an ischemic lesion of mouse brain.	J Stroke Cerebrovasc Dis.			2014



## Induction of autophagic cell death of glioma-initiating cells by cell-penetrating D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus

Yutaka Ueda<sup>a,b</sup>, Fan-Yan Wei<sup>a</sup>, Taku-ichiro Hide<sup>b</sup>, Hiroyuki Michiue<sup>c</sup>, Kentaro Takayama<sup>d</sup>, Taku Kaitsuka<sup>a</sup>, Hideo Nakamura<sup>b</sup>, Keishi Makino<sup>b</sup>, Jun-ichi Kuratsu<sup>b</sup>, Shiroh Futaki<sup>d</sup>, Kazuhito Tomizawa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Physiology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan

<sup>b</sup> Department of Neurosurgery, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan

<sup>c</sup> Department of Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan

<sup>d</sup> Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 August 2012

Accepted 2 September 2012

Available online 21 September 2012

#### Keywords:

Brain

Peptide

Drug delivery

Apoptosis

Cell proliferation

Protein transduction

### ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and fatal brain tumor. GBM is resistant to chemotherapy and radiation. Recent studies have shown that glioma-initiating cells (GICs), which have characteristics of cancer stem cells, are responsible for the resistance to chemotherapy and radiation and regrowth. No effective therapy for GICs has been developed. Here we showed that D-isomer peptides (dPasFHV-p53C') consisting of a cell-penetrating peptide (FHV), penetration accelerating sequence (Pas) and C-terminus of p53 (p53C') induced the cell death of GICs. dPasFHV-p53C' was effectively transduced into human GICs. The peptides dose-dependently inhibited cell growth and at 3  $\mu$ M completely blocked the growth of GICs but not embryonic stem cells. Autophagic cell death was observed in the GICs treated with dPasFHV-p53C' but apoptosis was not. dPasFHV without p53C' showed the same effect as dPasFHV-p53C', suggesting Pas to play a critical role in the cell death of GICs. Finally, dPasFHV-p53C' reduced tumor mass in mice transplanted with GICs. Peptide transduction therapy using dPasFHV-p53C' could be a new method for the treatment of GBM.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most aggressive human tumors with a poor prognosis. The median survival of patients with GBM is less than 1 year, mainly because conventional postsurgical chemotherapeutic agents and irradiation exhibit limited effects [1,2]. A small subpopulation of CD133-positive cells has been identified in specimens of GBM and called glioma-initiating cells (GICs) [3,4]. The cells express additional stem cell markers, exhibit self-renewal and differentiation into glial and neuronal lineages, and can initiate xenograft tumors [5,6]. GICs are the only cell population with tumorigenic capacity in GBM and may possess innate resistance mechanisms against radiation- and chemotherapy-induced cell death, allowing them to survive and initiate tumor recurrence [7]. New approaches to GICs are needed for the treatment of GBM.

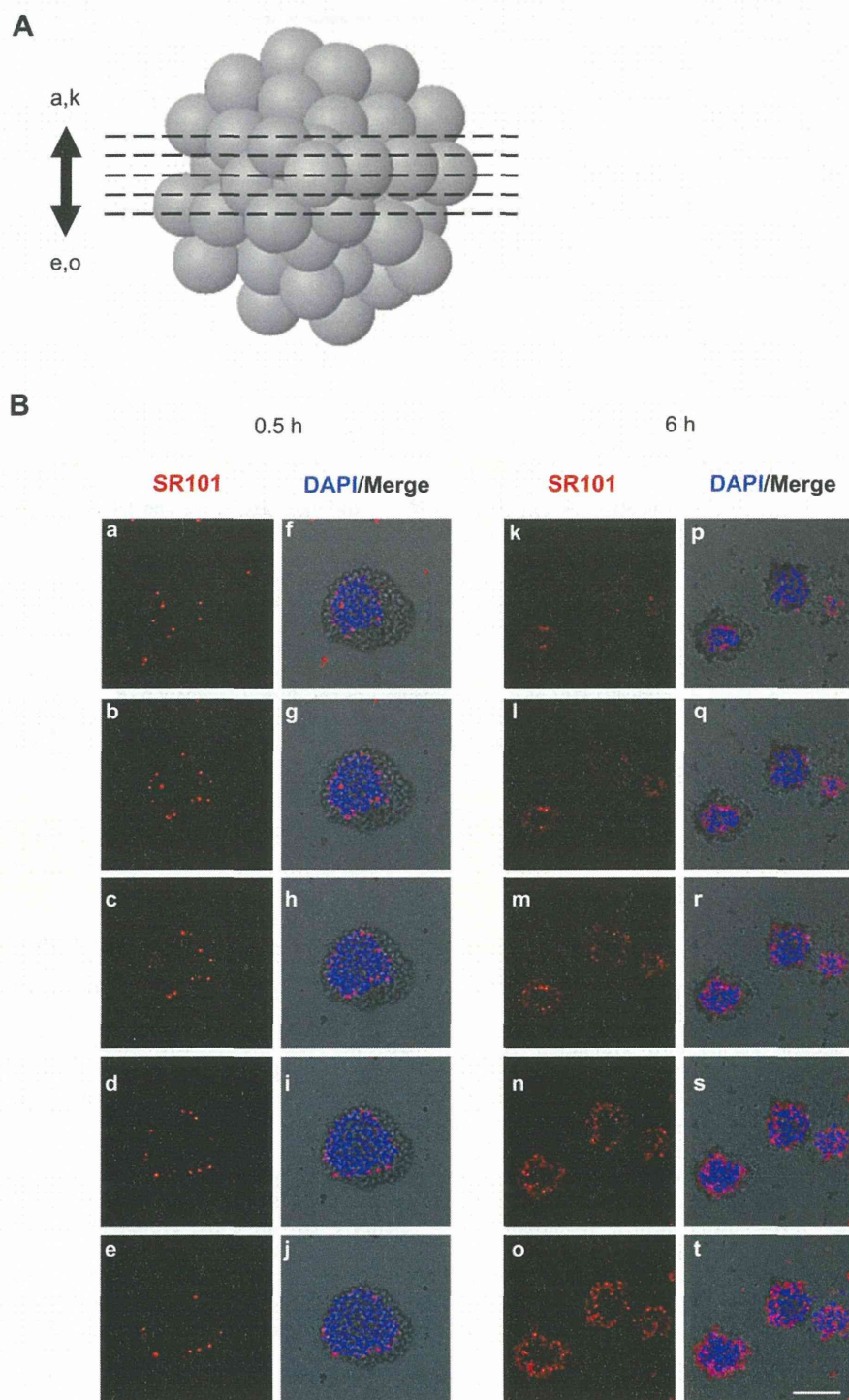
The C-terminus of p53 (p53C'), a biologically active tumor suppressor protein, is a lysine-rich domain subject to a variety of posttranslational modifications [8,9]. A peptide derived from the C-terminus activates specific DNA-binding by p53 *in vitro* through an unknown mechanism [10] and functions as a potent anticancer peptide [11]. Intracellular protein delivery using membrane-permeable peptide vectors has received increasing attention as a highly efficient way to modify cellular functions with therapeutic potential [12–14]. The vectors are often referred to as cell-penetrating peptides (CPPs) or protein transduction domain (PTD) peptides. Through conjugation with a short peptide vector (<12 amino acid residues) such as the PTD of the human immunodeficiency virus type 1 TAT protein (TAT), poly-arginine, and the PTD derived from flock house virus (FHV), various proteins have been introduced into cells and have successfully exerted their functions [12–14]. Previous studies have shown that D-isomer retro-inverso peptides consisting of p53C' and TAT, which display greater stability, induce the apoptosis of cancer cells and significantly increase lifespan in animal models of terminal peritoneal carcinomatosis and peritoneal lymphoma expressing wild-type p53

\* Corresponding author. Tel.: +81 96 373 5050; fax: +81 96 373 5052.  
E-mail address: [tomikt@kumamoto-u.ac.jp](mailto:tomikt@kumamoto-u.ac.jp) (K. Tomizawa).



[11,15]. However, a high concentration of the peptides is needed for the growth inhibition of cancer cells because the transduced peptides are mostly entrapped in macropinosomes, and then carried and degraded in lysosomes fused with macropinosomes [16].

Cathepsin D is a lysosomal enzyme that can cleave peptide segments such as KPILFFRLK [17]. We recently found that a retro sequence peptide of the cathepsin D-cleavable sequence (FFLIPKG) called the penetration accelerating sequence (Pas), enhanced the efficiency of intracellular delivery of bioactive peptides using



**Fig. 1.** Delivery of dPasFHV-p53C'-SR101 into human GICs. (A) Scheme of the images of serial optical sections in B. The images were multiple optical 4- $\mu$ m step sections scanning the Z-dimension of laser scans of the sphere of GICs. (B) GICs that formed spheres were incubated with 10  $\mu$ M dPasFHV-p53C'-SR101 for 0.5 and 6 h. After washing with PBS, SR101 signals (red) were observed with a laser confocal microscope. All nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 100  $\mu$ m.

arginine-rich CPPs by breaking the macropinosomal membrane [18]. Moreover, the D-isomer peptides of p53C' fused with the PTD of FHV and Pas (dPasFHV-p53C') more significantly inhibited the growth of human glioma and bladder cancer cells, and induced apoptosis [18,19]. These results led us to believe that dPasFHV-p53C' may be a tool for GBM therapy. However, the effect of the peptides on GICs is unclear. We have established human GIC lines that not only retain the characteristics of neural stem cells, but also form GBM with their original pathological features when transplanted *in vivo* [20]. In the present study, we examined the effect of dPasFHV-p53C' on human GICs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Peptide synthesis

All of the peptides used were chemically synthesized by Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) solid-phase peptide synthesis on a Rink amide resin as described previously [18]. Briefly, deprotection of the peptide and cleavage from the resin were achieved by treatment with a trifluoroacetic acid/ethanedithiol mixture (95:5) at room temperature for 3 h followed by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) purification. Fluorescent labeling of the peptides was conducted by treatment with sulforhodamine 101 (SR101) (Invitrogen, Carlsbad, CA) in a dimethylformamide (DMF)/methanol mixture (1:1) for 1.5 h followed by HPLC purification. The structure of the products was confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS).

The structure of each peptide was as follows

#### 1. dPasFHV-p53C':

FFLIPKGRRRRRNRTRNRNRVR-G-KKHRSTSGGKKSLHSSSHARSG-amide

#### 2. dPasFHV-p53C'-SR101:

FFLIPKGRRRRRNRTRNRNRVR-G-KKHRSTSGGKKSLHSSSHARSGC(SR101)-amide

#### 3. dPasFHV:

FFLIPKGRRRRRNRTRNRNRVR

#### 4. D-p53C' (control peptide):

KKHRSTSGGKKSLHSSSHARSG-amide

#### 5. L-p53C' (control peptide):

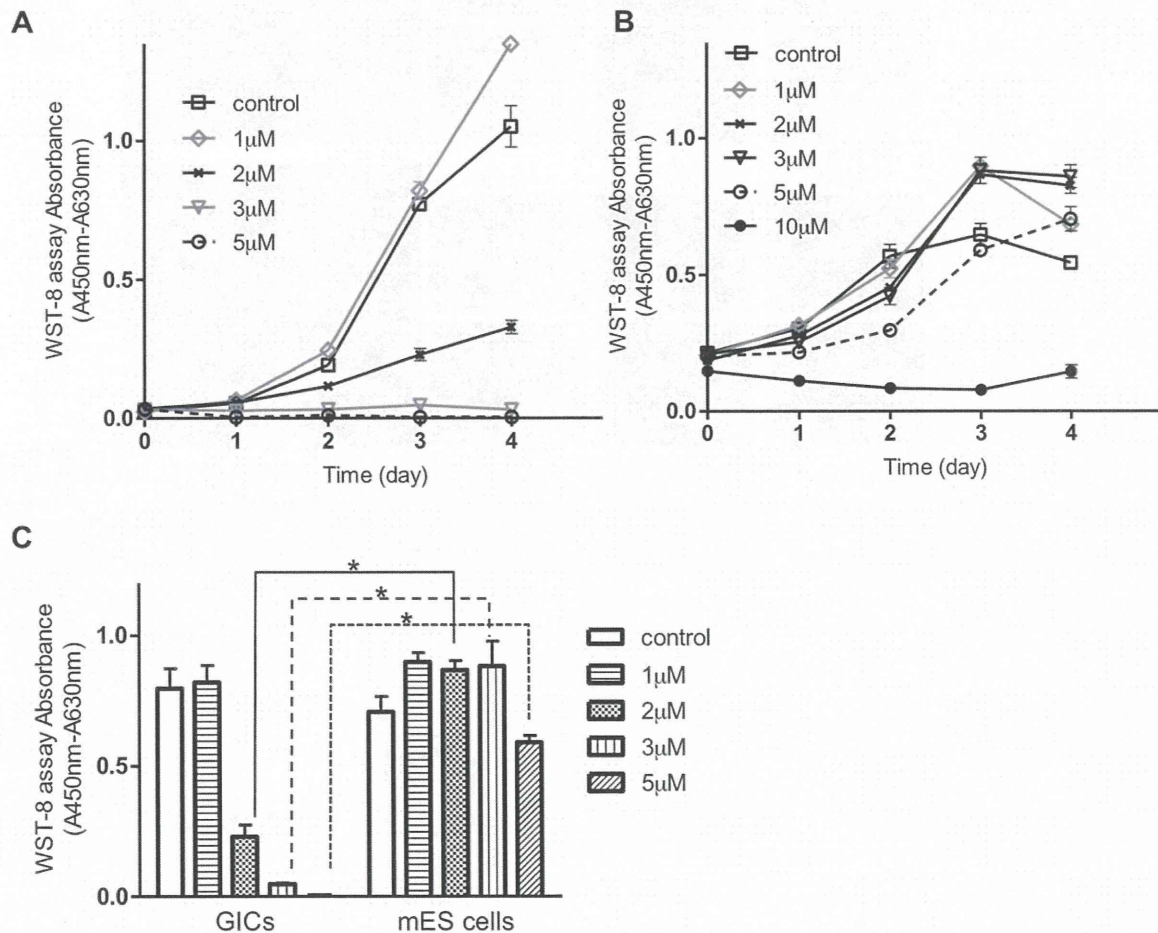
KKHRSTSGGKKSLHSSSHARSG-amide.

The Pas segment is highlighted by the dashed line. The D-amino acids are shown in italics. A Gly residue was inserted as a linker to connect the dPasFHV/dFHV and p53C' segments.

### 2.2. Cell culture

#### 2.2.1. Preparation of GICs

Primary human GBM samples were obtained with consent from patients diagnosed with GBM and underwent surgical resection in Kumamoto University Hospital according to the guidelines of the University's Research Ethics Committee. The study was approved by the Ethics Committee. GICs were isolated from the samples as described previously [21]. Briefly, tumor samples were washed twice



**Fig. 2.** Dose-dependent effect of dPasFHV-p53C' on the growth of GICs (A) and mouse embryonic stem cells (B). Cells were incubated with each concentration of the peptide for the period indicated. As a control, cells were treated with 10 μM D-p53C'. The growth was evaluated with the WST-8 assay. (C) Comparison of the inhibitory effect of each concentration of peptide on the growth on day 4.  $n = 4$  each. \* $P < 0.001$ .



with PBS and dissociated with an enzymatic solution containing 0.25% Trypsin in 0.1 mM EDTA at 37 °C for 60 min. Dissociated cells were then cultured as tumor spheres in serum-free DMEM/F-12 (Invitrogen) containing human basic fibroblast growth factor (bFGF; 20  $\mu$ M, Wako, Osaka, Japan), human epidermal growth factor (EGF; 20  $\mu$ M, Peprotech, Rocky Hill, NJ), human leukemia inhibitory factor (LIF; 20  $\mu$ M, Millipore, Billerica, MA), heparin (5  $\mu$ M, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), insulin (10  $\mu$ M, Sigma–Aldrich), N2 supplement (1%, Invitrogen) and B27 supplement (1%, Invitrogen) prior to use.

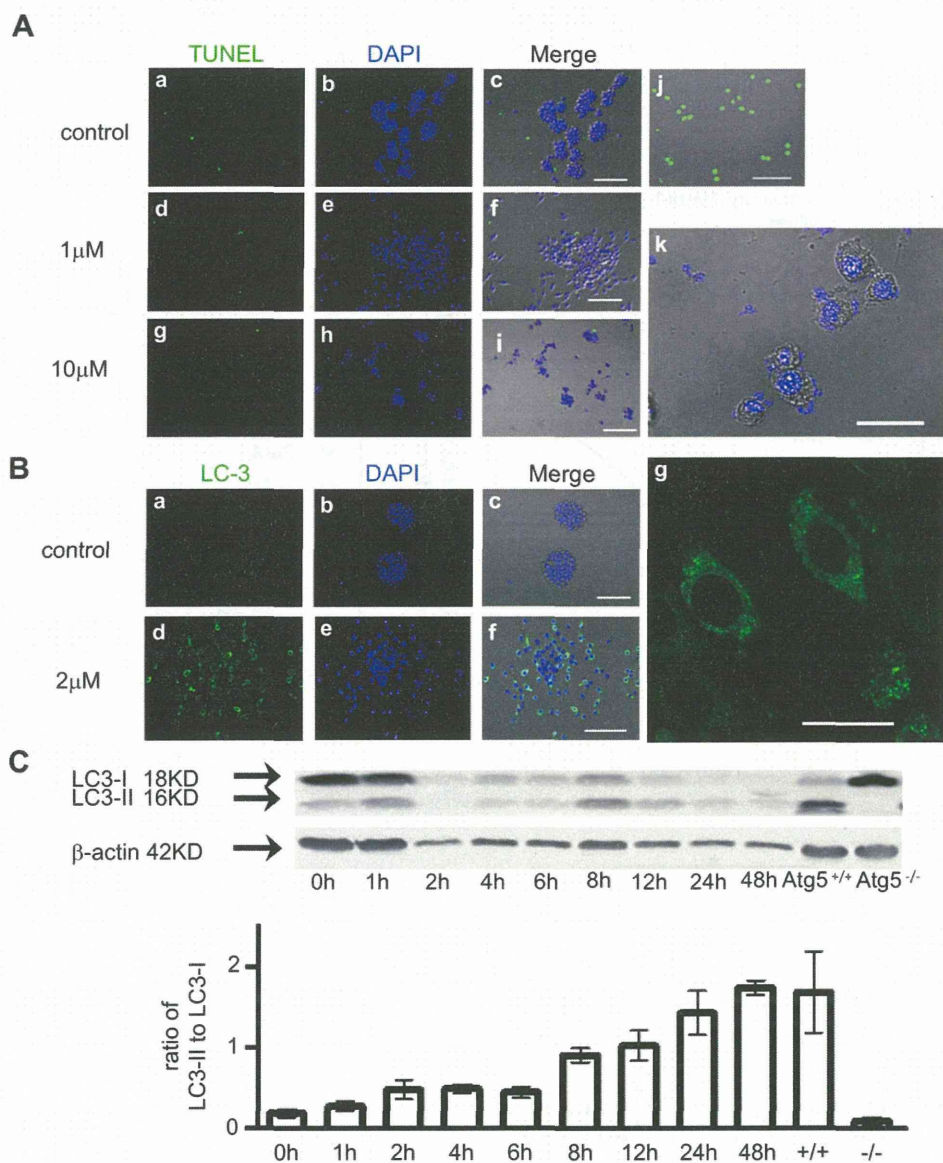
### 2.2.2. Mouse embryonic stem (ES) cells

The mouse ES cell line, ING112, containing a *Ins1*-promoter-driven GFP reporter transgene, was established by culturing blastocysts obtained from transgenic mice homozygous for the *Ins1*-GFP gene [22]. Cells were maintained on mouse embryonic fibroblast (MEF) feeders in Glasgow MEM supplemented with 1000 units/ml leukemia inhibitory factor (LIF), 15% Knockout Serum Replacement (KSR, Invitrogen), 1% fetal bovine serum (FBS), 100  $\mu$ M nonessential amino acids (NEAA), 2 mM

L-glutamine (L-Gln), 1 mM sodium pyruvate, 50 units/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin (P/S), and 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME). MEFs lacking *Atg5* (*Atg5*<sup>−/−</sup> MEF) and wild-type MEFs (*Atg5*<sup>+/+</sup> MEF) were obtained from RIKEN CELL BANK (Tsukuba, Japan). The cells were maintained in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3. Cell viability assay (WST-8 assay)

Cell viability was determined using a WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] assay kit (Dojindo, Kumamoto, Japan). The sphere of GICs was dissociated into single cells using 0.02% EDTA. The cells were then seeded into 96-well plates and incubated with each concentration of peptide for the period indicated. Cell viability was measured every 24 h according to the manufacturer's instructions.



**Fig. 3.** Induction of autophagy but not apoptosis of GICs with dPasFHV-p53C'. (A) TUNEL staining of GICs treated with 10  $\mu$ M d-p53C' peptide (control, a–c), 1  $\mu$ M dPasFHV-p53C' (d–f), and 10  $\mu$ M (g–i) dPasFHV-p53C'. TUNEL staining was performed 24 h after each peptide application. Nuclei were stained with DAPI (b, e, h and k). For a positive control of TUNEL staining, GICs were treated with 1 mM hydrogen dioxide for 24 h (j). Scale bars, 100  $\mu$ m (c, f, i and j); 20  $\mu$ m (k). (B) Immunocytochemical analysis of LC3 in GICs treated with 10  $\mu$ M d-p53C' peptide (a–c) and 2  $\mu$ M dPasFHV-p53C' (d–f). High magnification view of LC3-positive cells treated with 2  $\mu$ M dPasFHV-p53C' (g). Scale bars, 100  $\mu$ m (c, f); 20  $\mu$ m (g). (C) Comparison of protein levels between LC3-I and -II. Both protein levels were analyzed by Western blotting with anti-LC3 antibodies. Each protein level was normalized with  $\beta$ -actin. As a control, MEFs lacking *Atg5* (−/−) and possessing wild-type *Atg5* (+/+) were treated with serum-free medium for 24 h. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. n = 4 each.



## 2.4. TUNEL assay

The TUNEL assay was performed using an *in situ* cell death detection kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) as described previously [23]. Twenty-four hours after the application of each peptide, cells were fixed with 4% paraformaldehyde dissolved with phosphate-buffered saline (PBS) at 37 °C for 20 min. They were then washed in PBS and treated with 0.1% Triton X-100 at 4 °C for 5 min. After being rinsed, cells were incubated with the TUNEL reaction mixture at 37 °C for 60 min. The nuclei were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

## 2.5. Transmission electron microscopy of autophagosomes in cells

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde for 60 min at 37 °C. Cells were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4), dehydrated in a graded ethanol series, and flat embedded in Araldite. Ultrathin sections (40–60 nm thick) were placed on grids (200 mesh), and double-stained with uranyl acetate and lead citrate. The sections were observed under an electron microscope (H-7650, Hitachi, Tokyo, Japan).

## 2.6. Immunocytochemistry

Immunocytochemical staining for Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) was performed using anti-LC3 polyclonal antibody (Medical & Biological Lab., Nagoya, Japan) as described previously [23]. GICs treated with peptide were fixed with 4% paraformaldehyde–PBS at 37 °C for 20 min, washed in PBS, and incubated with 0.1% Triton X-100 at 4 °C for 5 min. The cells were pretreated with 3% BSA in PBS for 30 min at room temperature, and immunostained with the antibody (1:1000) overnight at 4 °C. Images were obtained using a confocal microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan).

## 2.7. Western blotting

Western blotting was performed as described previously [24]. Cells were plated on 6-well dishes 3 days before treatment with each peptide. Cells treated with peptides were lysed with lysis buffer [20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0.2% SDS, and protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich)]. Protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL), and 50 µg of cell lysate was used for Western blotting. Cell lysates were mixed with loading buffer and boiled for 5 min. The lysates were then separated by SDS–PAGE on a 10% acrylamide gel and transferred to immobilon membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked for 1 h in 10% skim milk in PBS (pH 7.2), and probed overnight with the primary antibodies to detect LC3 (Medical & Biological Lab.), Atg5 (Abcam, Cambridge, UK), and actin (Ab-I, Oncogene Science, Cambridge, MA) as an internal control. Subsequently, membranes were probed with HRP-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Detection was performed using chemiluminescence, according to the manufacturer's recommendations (DuPont, Boston, MA).

## 2.8. Transfection of siRNA

siRNA oligonucleotides (Nucleic sequences, GAUAUGGUUUGAAUAUGAATT and UUCAUAUUAACCAUAUUCTT) targeting the Atg5 mRNAs were obtained from Sigma–Aldrich. Transfection of siRNA was performed with Lipofectamine™ RNAi-MAX (Invitrogen). An unmodified oligo (44–2926, Invitrogen) was used as a control. GICs seeded on 96-well plates were transfected with siRNA oligonucleotides (50 nM) according to the manufacturer's directions and incubated for 72 h.

## 2.9. Mouse models of GBM

The mice were obtained from Charles River Laboratories Japan (Yokohama, Japan). All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Kumamoto University.

### 2.9.1. Intracranial transplantation of GICs into the brain of nude mice

Human GICs ( $1 \times 10^3$  cells) were suspended in 3 µl of PBS and injected into the brain of 5- to 8-week-old female nude mice that had been anesthetized with 10% pentobarbital. The stereotactic coordinates of the injection site were 2 mm forward from lambda, 2 mm lateral from the sagittal suture, and 5 mm deep.

### 2.9.2. Subcutaneous transplantation of GICs

Subcutaneous models were established by injecting  $1 \times 10^4$  GICs suspended in 3 µl of PBS subcutaneously into the right back of anesthetized nude mice. Tumor size was measured daily using calipers. When the subcutaneous tumor reached ~6.2 mm in diameter, 450 or 45 µg/kg of peptide was injected around the tumor once a day for 5 successive days.

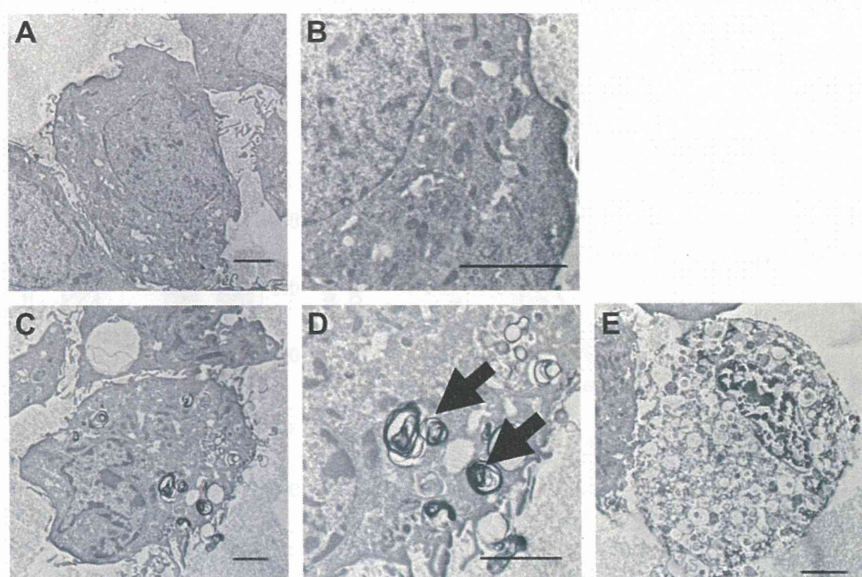
## 2.10. Statistical analysis

Data are shown as the mean ( $\pm$ S.E.M.). Data were analyzed using either Student's *t* test to compare two conditions or ANOVA followed by planned comparisons of multiple conditions, and  $p < 0.05$  was considered to be significant. Survival curves were generated according to the Kaplan–Meier method, and differences in survival were analyzed by the Wilcoxon rank-sum test.  $P < 0.05$  was considered significant.

# 3. Results

## 3.1. Efficiency of the delivery of dPasFHV-p53C'-SR101 into human GICs

dPasFHV-p53C' is delivered effectively into human glioma cells and the peptide has a long-lasting anti-tumor effect [18]. In the present study, it was first examined whether dPasFHV-p53C' was



**Fig. 4.** Electron microscopic analysis of GIC cells treated with 2 µM D-p53C' (A and B), and 2 µM (C and D) and 10 µM (E) dPasFHV-p53C' for 24 h. Arrows in D show autophagosomes. Scale bars, 2 µm.



delivered into human GICs. Human GICs were incubated with 10  $\mu$ M dPasFHV-p53C'-SR101 for 0.5 and 6 h (Fig. 1A). SR101 signals were detected only at the surface of spheres of GICs 0.5 h after the application (Fig. 1Ba–j). However, the signal had diffused into the core of the spheres 6 h after the transduction (Fig. 1Bk–t), suggesting that dPasFHV-p53C' was effectively delivered in GICs.

### 3.2. Dose-dependent effect of dPasFHV-p53C' on the growth of GICs

The dose-dependent effect of dPasFHV-p53C' on the cell growth of GICs was examined next. The cells were treated with 1, 2, 3, 5, and 10  $\mu$ M of the peptide for a specific period and the WST-8 assay was performed. d-p53C' (10  $\mu$ M) was used as a control. The peptide had no effect at 1  $\mu$ M, but dose-dependently inhibited growth at more than 2  $\mu$ M (Fig. 2A,C). At 3 and 5  $\mu$ M, it almost completely inhibited the growth (Fig. 2A,C). To investigate whether the peptide affects the growth of normal stem cells, mouse embryonic stem (mES) cells were treated with each concentration of dPasFHV-p53C'. Lower concentrations (1–5  $\mu$ M) of the peptide had no effect whereas 10  $\mu$ M of the peptide inhibited growth (Fig. 2B,C).

### 3.3. Observation of autophagy of GICs by dPasFHV-p53C'

We expected dPasFHV-p53C' to induce the apoptosis of GICs as an effect on glioma cells [18] and examined whether the peptide induced apoptosis with the TUNEL assay. However, 1 and 10  $\mu$ M peptides did not increase the TUNEL-positive cells although many cells died when treated with 10  $\mu$ M peptide (Fig. 3A). Moreover, condensed chromatin was not observed in GICs treated with 10  $\mu$ M peptide (Fig. 3a–k).

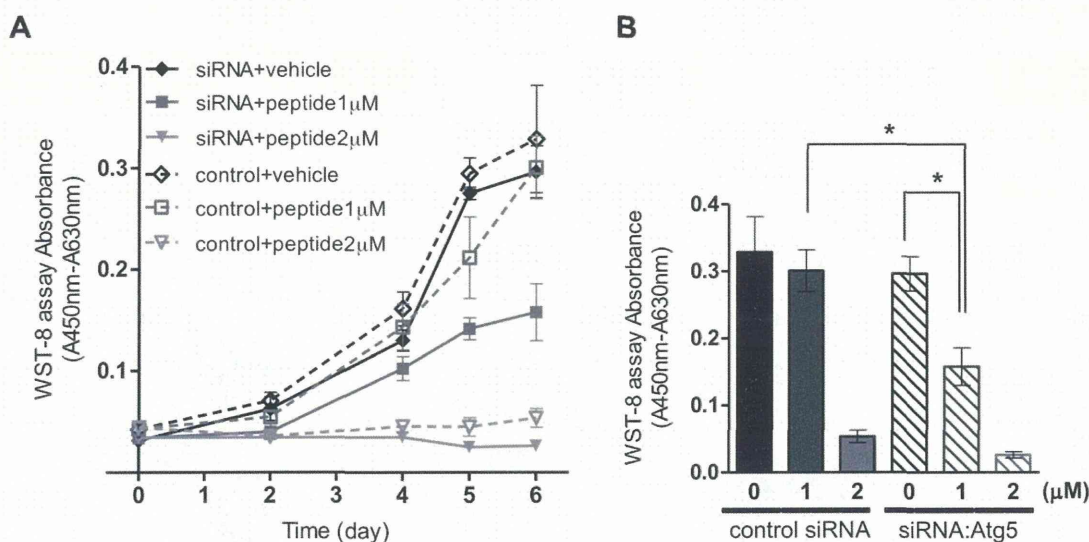
Autophagy is a cellular pathway involved in protein and organelle degradation [25] and frequently activated in tumor cells following treatment with chemotherapeutic drugs [26,27] or  $\gamma$ -irradiation [28]. We next examined whether dPasFHV-p53C' induces the autophagy of GICs. Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) is a marker of autophagosomes. LC3 is processed by Atg4 and becomes LC3-I [29]. Upon the induction of autophagy, the C-terminal glycine of LC3-I is conjugated to phosphatidylethanolamine, resulting in the formation of

membrane-bound LC3-II [30]. Most LC3-II is present on the autophagosome membrane [30]. In the present study, LC3 was diffusely and faintly expressed in the cytoplasm of GICs treated with control peptide (Fig. 3Ba–c). In contrast, dense staining of LC3 was observed in the cytoplasm of cells treated with 2  $\mu$ M peptide for 24 h (Fig. 3Bd–f). Higher magnification revealed the formation of autophagosome vacuoles (green dots) in GICs treated with the peptide (Fig. 3Bg). Protein levels of LC3-II were analyzed with immunoblotting. LC3-II levels increased in a time-dependent manner after treatment with dPasFHV-p53C' (Fig. 3C). As a control, LC3-II protein levels were increased in Atg5<sup>+/+</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEFs) when incubated in serum-free medium for 24 h whereas LC3-II levels were faint in Atg5<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 3C).

Electric microscopic analysis revealed double-membraned autophagic vacuoles in the cytoplasm of GICs treated with 2  $\mu$ M dPasFHV-p53C' for 24 h (Fig. 4C and D), whereas GICs treated with control peptide didn't exhibit these features (Fig. 4A and B). When GICs were treated with 10  $\mu$ M dPasFHV-p53C', much vacuolar degeneration occurred with collapsed autophagosomes seen in the cytoplasm but no condensed chromatin or fragmented nuclei, which are features of apoptosis (Fig. 4E). These results suggest that dPasFHV-p53C' induced autophagic cell death but not apoptosis of GICs.

### 3.4. Effect of autophagy on the growth inhibition of GICs by dPasFHV-p53C'

Autophagy is thought to promote the survival of tumor cells in the face of chemotherapeutic drugs and radiation [31]. We next examined whether inhibition of autophagy induces the inhibitory effect of dPasFHV-p53C' on the growth of GICs. GICs were treated with siRNA for Atg5, a protein essential to the formation of autophagosome vesicles, and control siRNA. After 72 h, cells were treated with dPasFHV-p53C' (day 0) and growth was evaluated with the WST-8 assay. RNAi-mediated knockdown of Atg5 did not affect the growth of GICs (Fig. 5A and B). However, the knockdown induced an inhibitory effect of dPasFHV-p53C' on the growth when treated with 1  $\mu$ M of the peptide (Fig. 5A and B).



**Fig. 5.** Effect of knockdown of Atg5 on dPasFHV-p53C'-mediated inhibition of the growth of GICs. (A) GICs were transfected with siRNA of Atg5 (siRNA) and control siRNA (control). After 72 h, cells were treated with 1 and 2  $\mu$ M dPasFHV-p53C' (peptide) and vehicle only (vehicle) (day 0). The WST-8 assay was performed every 24 h after the application for 6 successive days. (B). Comparison of the growth at day 6 among each treatment.  $n = 8$  each. \* $P < 0.001$ .



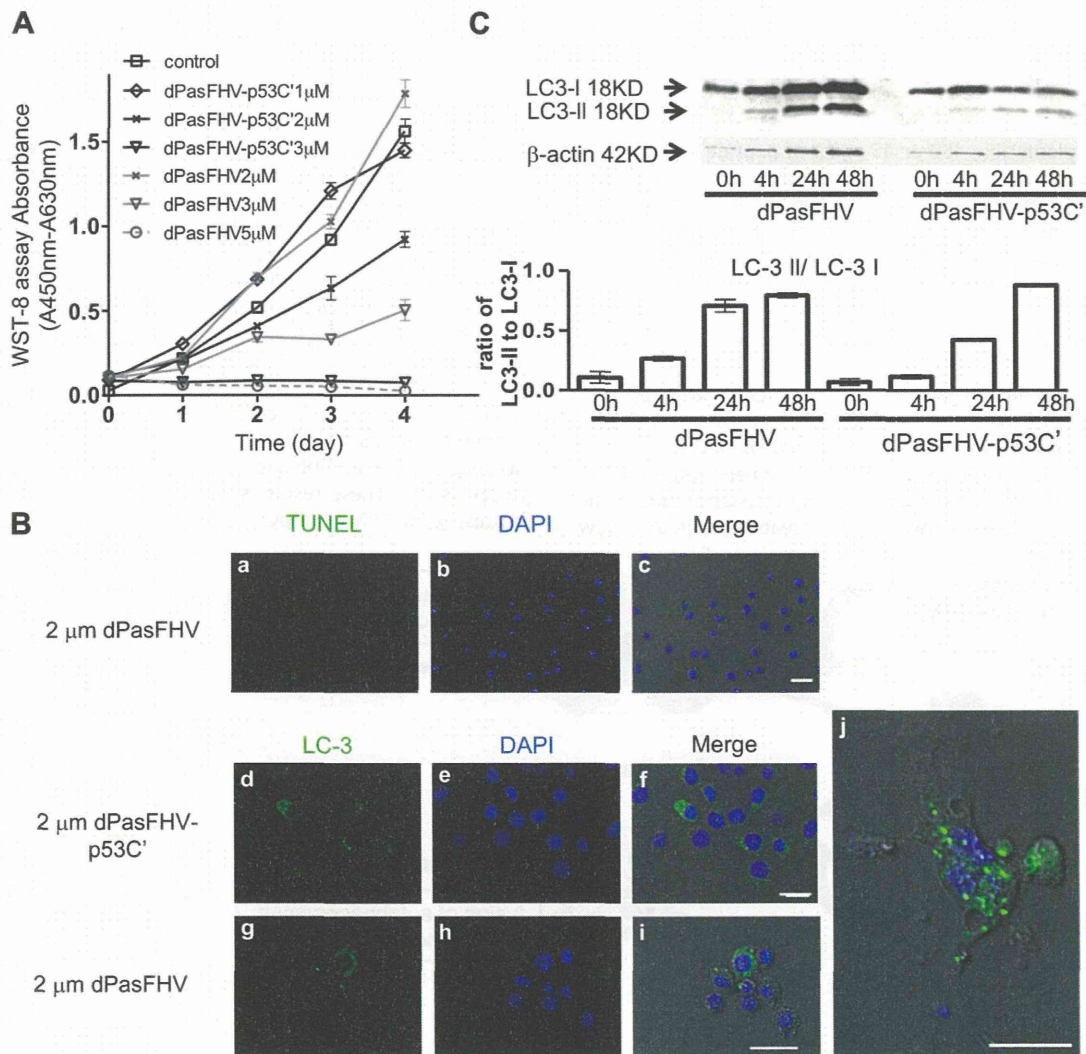
### 3.5. Effect of dPasFHV on autophagic cell death of GICs

Previous studies have shown that p53C' induces apoptosis of cancer cells but not autophagic cell death [11,19]. Therefore, p53C' is unlikely to induce autophagy in GICs. Cancer cells resist chemotherapy and radiation by induction of autophagy [26–28]. For this resistance to be achieved, autophagosomes must fuse with lysosomes [31]. Pas may prevent this because the peptide enhances the translocation of CPPs through endosomal and macropinosomal membranes [18]. We next examined whether dPasFHV without p53C' induced autophagic cell death of GICs. dPasFHV had no effect on the growth of GICs when applied at 2  $\mu$ M (Fig. 6A). However, at 3  $\mu$ M it significantly inhibited, and at 5  $\mu$ M, completely inhibited the growth (Fig. 6A). The peptides did not induce the apoptosis of GICs the same as dPasFHV-p53C' (Fig. 6B). When GICs were treated with 2  $\mu$ M dPasFHV, dense staining of LC3 was observed in the cytoplasm. LC3-II levels also increased after treatment with dPasFHV in a time-dependent manner (Fig. 6C). These results suggest that dPasFHV induces the autophagic cell death of GICs.

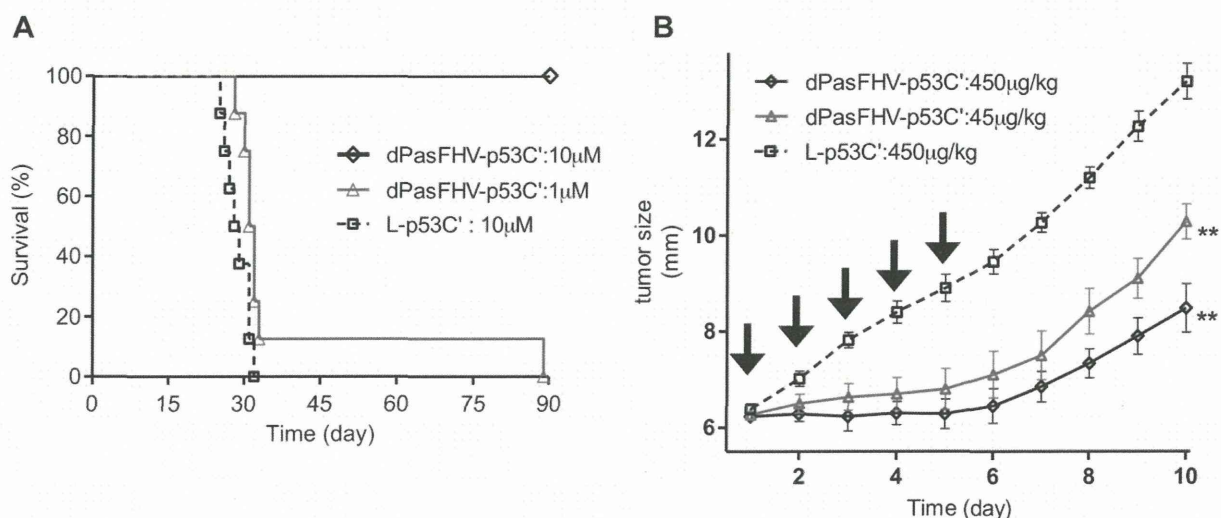
### 3.6. Effect of dPasFHV-p53C' on survival of tumor-bearing mice and the growth of xenografts of GICs

Finally, we examined the inhibitory effect of dPasFHV-p53C' on the growth of GICs *in vivo*. The spheres of GICs were dissociated into single cells, and the cells were treated with 1 and 10  $\mu$ M dPasFHV-p53C' and 10  $\mu$ M L-p53C' (control peptide) for 2 h. GICs ( $1 \times 10^3$  cells) were then transplanted into the brain of nude mice stereotactically (day 0). GBM formed with human pathological features such as necrotic regions with surrounding pseudopalisades, vascular proliferation, and dividing tumor cells (Supplementary Fig. 1). All of the tumor-bearing mice treated with control peptide developed GBMs and died within 32 days (Fig. 7A). The survival of mice transplanted with GICs treated with 1  $\mu$ M peptide was slightly prolonged (Fig. 7A). All of the tumor-bearing mice treated with 10  $\mu$ M peptide survived for 90 days (Fig. 7A).

GICs ( $1 \times 10^4$  cells) were subcutaneously transplanted into nude mice. When the tumor grew to 6.2 mm in diameter about 2 weeks



**Fig. 6.** Effect of dPasFHV on the growth (A) and induction of autophagy (B and C) of GICs. (A) GICs were treated with each concentration of dPasFHV and dPasFHVp53C'. The growth was evaluated with the WST-8 assay,  $n = 4$  each. (B) GICs were treated with 2  $\mu$ M dPasFHV and dPasFHV-p53C' for 24 h. Cells were then stained with TUNEL (a–c) and immunostained with anti-LC3 antibodies (d–j). (j) High magnification view of LC3-positive cells treated with 2  $\mu$ M dPasFHV. The nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars, 20  $\mu$ m (c, f and i), 10  $\mu$ m (j). (C) The protein level of LC3-II increased time-dependently after treatment with 5  $\mu$ M dPasFHV. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M.  $n = 4$  each.



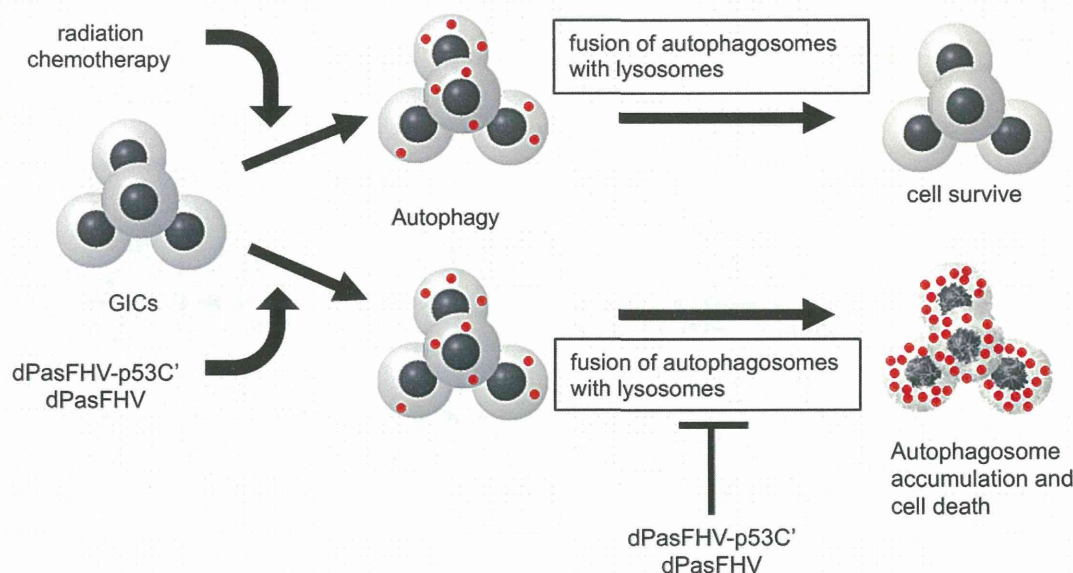
**Fig. 7.** (A) Effect of dPasFHV-p53C' on survival rates of nude mice transplanted with GICs ( $1 \times 10^3$ ) in the brain. Cells were treated with 1 and 10 μM dPasFHV-p53C', and 10 μM L-p53C' (control peptide) for 2 h before the transplantation. Nude mice were then transplanted with the cells at day 0. The survival of the mice was measured by monitoring life span and data were analyzed using the Kaplan–Meier method. (B) Effect of dPasFHV-p53C' on growth of tumors transplanted subcutaneously into nude mice. After a tumor had reached 6.2 mm in diameter, 45 or 450 μg/kg of peptide was injected around it once a day for 5 days. The diameter of the tumor was measured using calipers every 24 h.  $n = 6$  each.  $^{**}P < 0.001$  vs. control peptide.

after the transplantation, 450 or 45 μg/kg of peptide was injected around the tumor once a day for 5 successive days. L-p53C' was injected as a control. Tumor growth was completely inhibited until day 6 when treated with 450 μg/kg peptide (Fig. 7B). Tumor size gradually increased after 7 days but was significantly smaller than that of mice treated with control peptide at day 10 (Fig. 7B).

#### 4. Discussion

GBM is characterized by resistance to chemotherapy and radiotherapy. Therefore, the prognosis of patients with GBM remains extremely poor and has not changed significantly during the last decade [32]. CD133-positive GICs have been implicated in the enhanced radiation- and chemotherapy-resistance and in the repopulation of tumors following these treatments [6,33]. New

strategies for killing GICs are indispensable to develop anti-GBM therapy. In the present study, we showed that dPasFHV-p53C' inhibited the growth of GICs in a dose-dependent manner. At 3 μM, the peptide almost completely inhibited the growth of the cells but had no effect on the growth of mouse embryonic stem cells. Moreover, the peptide significantly inhibited the growth of tumors in mice implanted with human GICs. We previously showed that dPasFHV-p53C' inhibited the growth of human malignant glioma cell lines [18], and induced the apoptosis of bladder cancer cells but had no effect on normal cells [19]. GBM is made up of intermingled glioma cells and GICs. To cure GBM, therefore, it is important to treat both cells. p53C' induced the apoptosis of cancer cells [19] and Pas induced the autophagic cell death of GICs as shown in the present study. These results suggest that dPasFHV-p53C' may be promising for GBM therapy.



**Fig. 8.** Scheme of the induction of autophagic cell death of GICs by dPasFHV-p53C' and dPasFHV.