

令和元年6月26日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10324

研究課題名(和文) Oct-3/4を標的とした悪性グリオーマ「万能型」分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of Oct-3/4 targeting drug for malignant glioma treatment

研究代表者

高橋 寿明 (Takahashi, Hisaaki)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：20363228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：浸潤性に発育する悪性グリオーマ治療は抜本的な改善に至っていないのが現状である。我々はこれまでにOct-3/4がグリオーマの予後不良因子(腫瘍幹細胞性、浸潤、血管新生、薬剤耐性)に正の相関を示すことを見いだしてきた。そこでOct-3/4プロモーター下でGFPを発現するヒト膠芽腫T98G細胞を樹立し、GFPの蛍光強度減弱を指標に、1,142種類の化合物(FDA承認および天然物由来)についてスクリーニングを行い、「万能治療薬」の開発を試みた。複数のヒット化合物の中から、臨床的にも有用性が高いと予想される化合物に着目し、腫瘍幹細胞性、浸潤、血管新生、薬剤耐性などに一定の効果があることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性グリオーマは根治が極めて困難な疾患であり、既存の分子標的薬も有効な治療効果をあげているとは言い難い。本研究の特色は、申請者らが継続して行ってきた一連の研究成果(悪性グリオーマにおけるOct-3/4の役割)に基づき、分子標的薬でありながら「万能型」でもある新しい治療薬の開発を目指した点である。1,134種類の化合物の中から得られた候補化合物はOct-3/4発現抑制による悪性グリオーマの治療効果が期待できることに加えて、既に治療薬として国内外で使用されていることから、開発コストの大幅な削減も期待でき、その社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Malignant gliomas are the most common, infiltrative, and lethal primary brain tumors. Accumulating evidence shows that the expression level of Oct-3/4, a self-renewal regulator in stem cells, is positively correlated with the progression of malignant glioma, such as cancer stemness, invasion, tumor angiogenesis, and chemoresistance. These findings suggest that suppression of Oct-3/4 might have a potential for solving all problems of glioma treatment. In this study, we established GFP expressing T98G cells under Oct-3/4 promoter, and 1,142 compounds were investigated by detecting the attenuation of fluorescence intensity on these cells. We found one compound in the candidate compounds for its potential use in malignant glioma treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膠芽腫 グリオーマ Oct-3/4 化合物スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマ治療において、DNAメチル化剤テモゾロミド(TMZ)の導入は非常に大きなブレイクスルーであった。しかしTMZ耐性症例も多く、化学療法剤による悪性グリオーマ治療の限界も示唆されている。一方で、グリオーマの腫瘍生物学的特性を利用した分子標的治療(血管新生阻害剤、EGF受容体阻害剤、MMP阻害剤など)の開発が進められ、その有効性が期待されてきたが、血管新生阻害薬においては病態の一時的な改善効果は認められるものの、浸潤性再発や低酸素反応性の血管新生といった問題点が指摘されており、有意な生存延長効果は認められていない。EGF受容体阻害剤においても有効性はごく限られた症例のみであり、単剤あるいはTMZとの併用療法でも十分な抗腫瘍効果を示す分子標的薬は見いだせていないのが現状である。

2. 研究の目的

浸潤性に発育する悪性グリオーマの治療には外科的切除、放射線治療、化学療法という多方面からのアプローチが必要であるが、上述した様にまだ治療成績の抜本的改善に至っていない。申請者はこれまでにiPS細胞作製に必須の分子Oct-3/4がグリオーマ浸潤、腫瘍幹細胞性維持、腫瘍血管新生さらには薬剤耐性といった悪性化要因全てにおいて正の相関を示すことを見いだしてきた。本研究はOct-3/4陽性のグリオーマ細胞を用い、Oct-3/4の発現を抑制する化合物を同定・評価するアッセイ系を確立し、腫瘍幹細胞の破綻までも可能とする「万能型」分子標的治療法の確立に向けた基盤構築を目的とする。

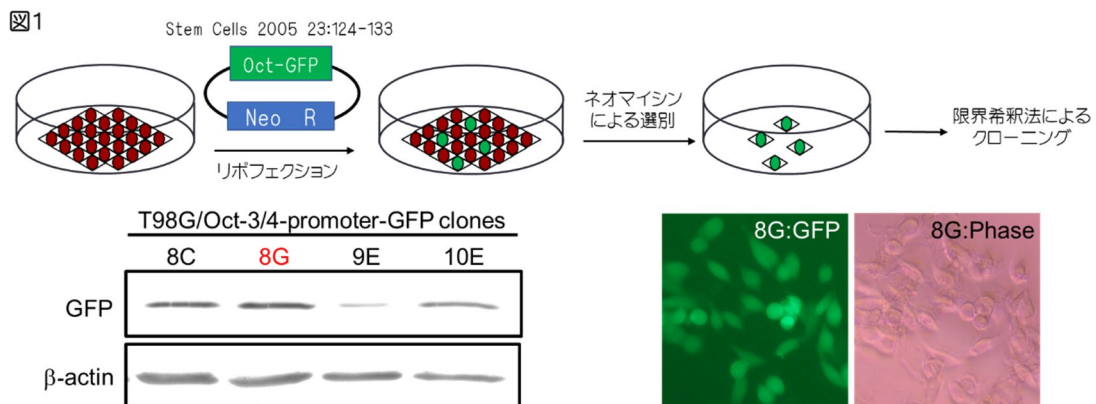
3. 研究の方法

- (1) Oct-3/4プロモーター下でGFPを発現するグリオーマT98G細胞の樹立
- (2) Oct-3/4プロモーター-GFPの発現を抑制する化合物(金沢大学がん伸展制御研究所)の一次スクリーニングならびに遺伝子発現解析による二次スクリーニング
- (3) 候補化合物の*in vitro*浸潤ならびにSphere形成の検討(三次スクリーニング)

4. 研究成果

- (1) Oct-3/4プロモーター下でGFPを発現するグリオーマT98G細胞の樹立

ヒトOct-3/4プロモーター(3,951bp)下でGFPを発現するplasmidをCui博士(Imperial College London)(Stem Cell 2005 23:124-133)より供与を受け、ヒト膠芽腫細胞株であるT98Gにリポフェクション法により遺伝子導入した。その後、G418(600µg/ml)で薬剤選別を行った後、さらに限界希釈法にてGFP陽性細胞のクローニングを行った。抗GFP抗体を用いたウエスタンブロット法にてGFP高発現細胞を選別し、クローン8G細胞をスクリーニングに用いることとした(図1)。



(2) Oct-3/4プロモーター-GFPの発現を抑制する化合物(金沢大学がん伸展制御研究所)のスクリーニング(一次)ならびに遺伝子発現解析による二次スクリーニング

96wellプレートに 1.8×10^4 cells/wellで細胞をまき、化合物を終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$ 添加した。ネガティブコントロールにはGFPを発現していないT98G細胞を用い、化合物の溶媒であるDMSOを添加した。培養72時間後、蛍光プレートリーダーにてGFPの蛍光強度を測定(Ex. 478nm、Em. 530nm)し、化合物非添加のGFP蛍光強度と比較した(図2、図3)。

図2

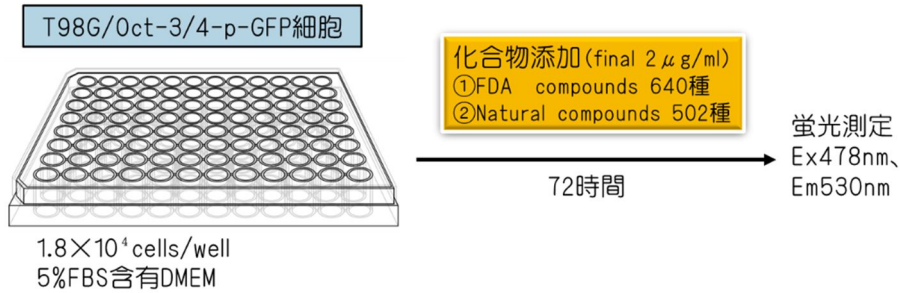
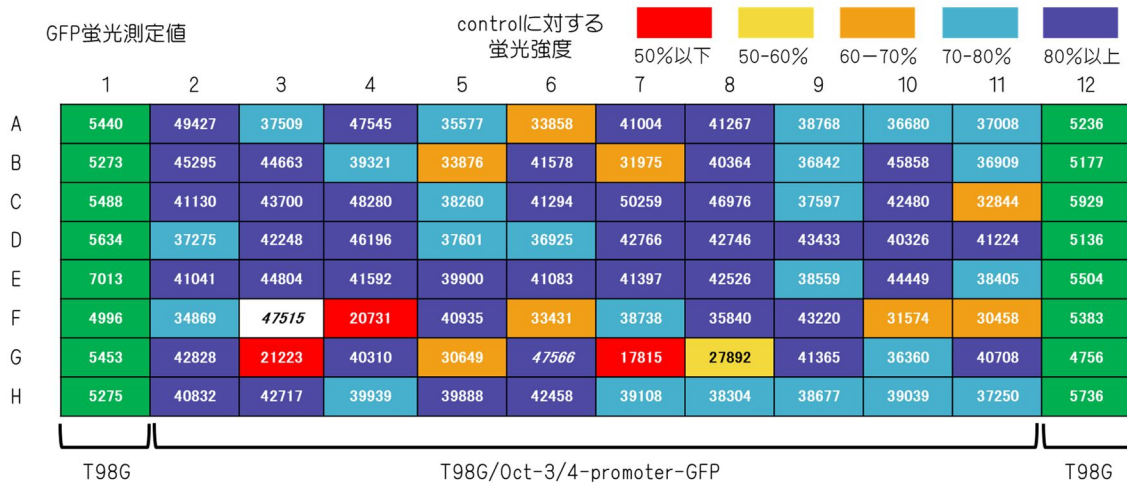


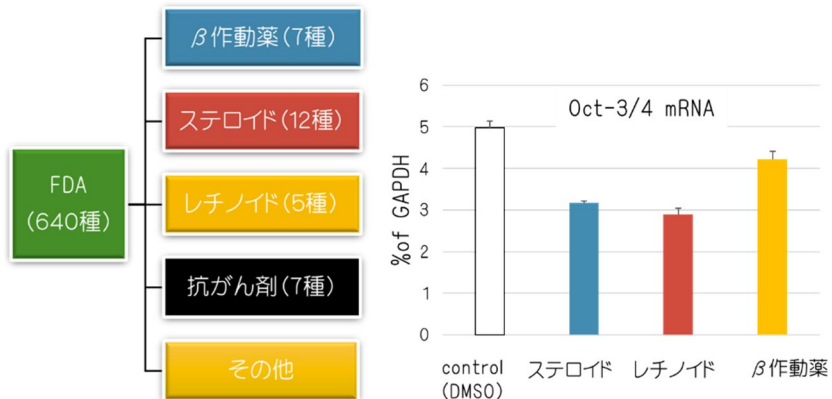
図3



FDA化合物ライブラリー(640種)からは作用機序的に4つのグループとその他に分けられる計36化合物がヒットした。また、天然物由来の化合物ライブラリー(502種)からは抗薬を中心として、計28化合物がヒットした(図4左)。

細胞毒性(LDHアッセイ)ならびにOct-3/4の発現抑制(リアルタイムPCR法)を指標に二次スクリーニングを行い、さらに臨床的有用性を考慮し、最終的にレチノイドとステロイドを最終候補化合物とした(図4右)。

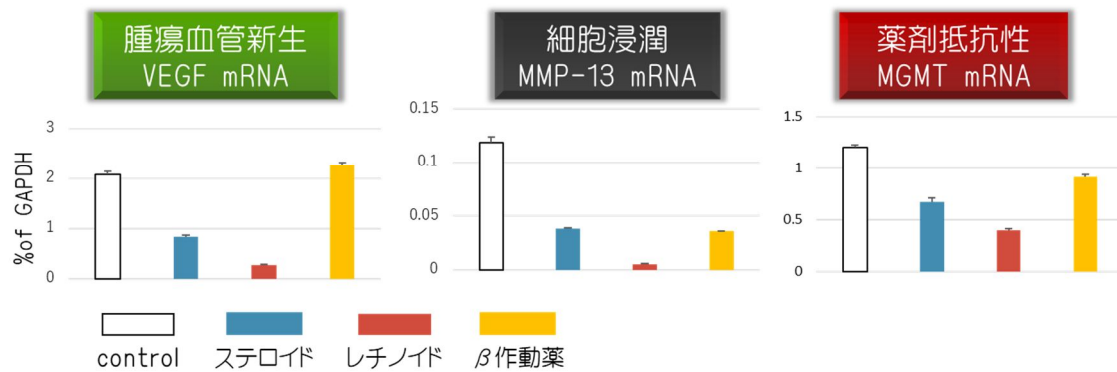
図4



(3) 候補化合物の *in vitro* 浸潤ならびに Sphere 形成の検討 (三次スクリーニング)

Oct-3/4 によって発現が誘導される悪性化因子の遺伝子発現についてリアルタイム PCR を用いて検討を行った。レチノイド、ステロイドともに、腫瘍血管新生に関わる VEGF mRNA、浸潤に関わる MMP-13 mRNA、テモゾロミドの薬剤耐性に関わる MGMT mRNA の全てにおいて、mRNA の発現を有意に抑制した (図5)。一方で、グリオーマの治療薬としての使用が難しいものの、Oct-3/4 の発現抑制が認められた 作動薬についても同様の検討を行ったが、VEGF の抑制は認められず、MGMT の発現抑制も弱いものであった。

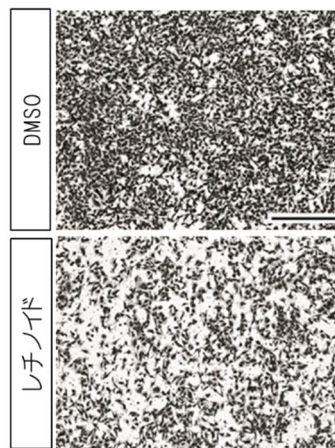
図5



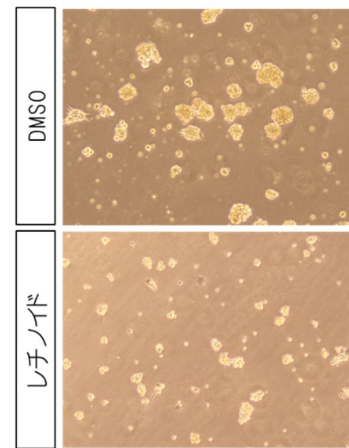
次にマトリゲルを用いた浸潤アッセイ (Boyden チャンバー法) ならびに Sphere アッセイ (EGF と bFGF を含む DMEM/F-12 無血清培地中で 8 日間培養) を行った (図6)。浸潤を完全に抑制しなかったものの、顕著な浸潤抑制が認められた。さらに Sphere アッセイにおいても、レチノイド処理により、形成された Sphere の数も極端に少なく、またサイズも小さかった。

図6

【マトリゲル浸潤アッセイ (24時間)】



【Sphere アッセイ (8日目)】



【まとめ】

本研究よりレチノイドによって T98G 細胞が有する未分化性が失われることで Oct-3/4 の発現が低下し、その結果、Oct-3/4 によって誘導されていた血管新生、細胞浸潤、薬剤耐性、腫瘍幹細胞化に関わる様々な因子の発現が低下したものと考えられる。目的とした“万能薬”となりうる可能性が大いに期待される。一方で、ステロイドでも悪性因子の発現を低下する結果が得られたが、長期的な服用を考えると副作用も強く、慎重にならざるを得ない。今後はこの結果を基に、脳腫瘍モデルマウスを用いて治療効果を検討する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(1) Takahashi H, Inoue A, Kawabe Y, Hosokawa Y, Iwata S, Kana Sugimoto, Yano H, Harada H, Ohue S, Ohnishi T, Tanaka J.

Oct-3/4 promotes tumor angiogenesis through VEGF production in glioblastoma.
BrainTumor Pathology 査読有(2015) 32:31-40.

(2) Yamashita D, Kondo T, Ohue S, Takahashi H, Ishikawa M, Matoba R, Suehiro A, Inoue A, Kohno S, Harada H, Tanaka J, Ohnishi T.

miR-340 acts as a tumor suppressor in tumorigenesis of human glioma-initiating cells by targeting plasminogen activator, tissue.
Cancer Res. 査読有 (2015) 75:1123-1133.

(3) Hosokawa Y, Takahashi H, Inoue A, Kawabe Y, Funahashi Y, Kameda K, Sugimoto K, Yano H, Harada H, Kohno S, Ohue S, Ohnishi T, Tanaka J.

Oct-3/4 modulates the drug-resistant phenotype of glioblastoma cells through expression of ATP binding cassette transporter G2.
Biochim Biophys Acta. 査読有 (2015) 1850:1197-1205.

(4) Inoue A, Tanaka J, Takahashi H, Kohno S, Ohue S, Umakoshi A, Gotoh K, Ohnishi T

Blood vessels expressing CD90 in human and rat brain tumors.
Neuropathology. 査読有 (2015) 36:168-180

(5) Nishikawa M, Inoue A, Ohnishi T, Kohno S, Ohue S, Matsumoto S, Suehiro S, Yamashita D, Ozaki S, Watanabe H, Yano H, Takahashi H, Kitazawa R, Tanaka J, Kunieda T.

Significance of Glioma Stem-Like Cells in the Tumor Periphery That Express High Levels of CD44 in Tumor Invasion, Early Progression, and Poor Prognosis in Glioblastoma.
Stem Cells Int. 査読有 (2018) 23:5387041

(6) Kuwabara J, Umakoshi A, Abe N, Sumida Y, Ohsumi S, Usa E, Taguchi K, Choudhury ME, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Takahashi H, Yorozuya T, Watanabe Y, Tanaka J.

Truncated CD200 stimulates tumor immunity leading to fewer lung metastases in a novel Wistar rat metastasis model.
Biochem Biophys Res Commun. 査読有 (2018) 496:542-548.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 井上明宏、高野昌平、大上史朗、大西丘倫、高橋寿明、田中潤也

Oct-3/4 の MGMT 発現調節機構への関与

第 34 回 日本脳腫瘍病理学会 2016 年(東京)

(2) 井上明宏、高野昌平、西川真弘、末廣諭、高橋寿明、田中潤也、國枝武治

膠芽腫における Oct-3/4 を介した MGMT 遺伝子発現調節と DNMT1 の関連性
日本脳神経外科学会 第 76 回学術総会 2017 年 (東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：田中 潤也
ローマ字氏名：Tanaka Junya
所属研究機関名：愛媛大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：70217040

研究分担者氏名：竹内 文也
ローマ字氏名：Takeuchi Fumiya
所属研究機関名：旭川医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：30281835

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。