

令和元年6月6日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10772

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対する核酸類縁体の抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Antitumor effect of nucleic acid analog, ribavirin, against malignant glioma cells

研究代表者

吉野 篤緒 (YOSHINO, Atsuo)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50256848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：核酸類縁体であるribavirin(Rib)は、悪性神経膠腫細胞(7種類)において、容量依存的抗腫瘍効果を認めた(10 μ Mでも効果を示し臨床応用が期待)。機序として、DNA double-strand breaksを惹起し、細胞周期をG0/G1に誘導、さらにアポトーシスも誘導(p53、外因性・内因性ともに活性化)することによると考えられた。

また、TMZ単剤、TMZ+Ribの2剤、およびTMZ+Rib+IFN- の3剤併用投与における比較検討では、TMZ感受性だけでなく耐性細胞においても、Ribの容量依存的な抗腫瘍効果を認めた。相乗的相互作用であり、アポトーシスの誘導が根底にあると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫(膠芽腫)における治療成績の改善は課題である。TMZが標準治療薬であるが満足すべきものではない。一方、核酸類縁体であるribavirin(Rib)は、抗ウイルス薬として報告され、抗腫瘍効果を示すという報告も散見されている。

本研究において、Ribはヒト悪性神経膠腫細胞株に対して、容量依存的に抗腫瘍効果を認めた。また、TMZ+Rib+IFN- の3剤の組み合わせは、TMZ耐性細胞においても、Ribの容量依存的に抗腫瘍効果(相乗的相互作用)を認めた。また、膠芽腫に対して有効なレジメとして期待される結果であった。なお、医薬品に対するDrug Repositioningという側もある。

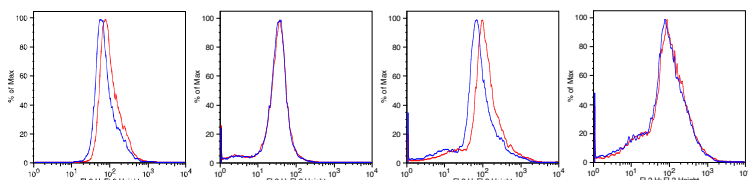
研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated a dose-dependent anti-tumor effect of ribavirin (Rib, a nucleic acid analog and an anti-viral agent) for seven types of malignant glioma cell lines. This study also suggested that Rib exerts an anti-tumor effect on malignant glioma cells due to the induction of double-strand breaks (a type of DNA damage), cell cycle arrest in G0/G1, and both exogenous and endogenous apoptosis. Furthermore, the combination of Rib with TMZ and IFN- displayed a significant cell growth inhibitory effect with a Rib dose-dependency, including a relatively low concentration of Rib, on not only TMZ sensitive but also TMZ resistant malignant glioma cells. Moreover, flow cytometry analysis suggested that apoptosis induction was one of the possible biological processes underlying the synergistic anti-tumor effect of these triple combination treatments. These findings may provide an experimental basis for rational clinical therapy with ribavirin for glioblastomas.

研究分野：脳腫瘍

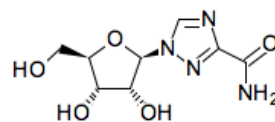
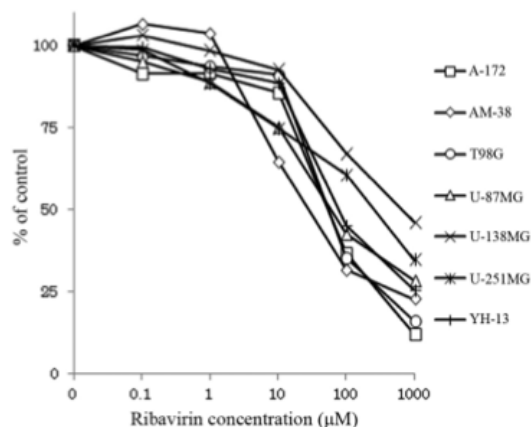
キーワード：脳腫瘍 膠芽腫 抗腫瘍効果 核酸類縁体 細胞周期 p53 アポトーシス temozolomide

1. 研究開始当初の背景

当教室では、予てより interferon-beta (IFN-β) に注目してきた。そして、星細胞腫 (WHO grade II) においては手術摘出度と IFN-β療法が有意な予後因子であること (J Neuro-Oncology. 2003)、悪性神経膠腫においては IAR 療法 (IFN-β+ACNU+放射線療法) が有効であることなどを報告してきた (J Neuro-Oncology. 2005)。また、glioblastoma の発生や再発、治療抵抗性に強く関与していると考えられているものに glioma stem-like cells (GSCs: 自己複製能と多分化能、そして腫瘍形成能をもつ未分化な細胞) があるが、IFN-βが non-GSCs から GSCs の変換 (未分化性の再獲得) を抑制することを報告している。下図 (J Neuro-Oncology. 2015)。



一方、Ribavirin は広域スペクトルな抗ウイルス薬として開発され (Sidwell RW. *et al.* Science. 1972)、C 型肝炎に対して IFN と併用する標準的治療薬となっている。また、IMPDH を阻害することでアデニンとグアニンの合成を阻害し細胞増殖を抑制することや (Yamada Y. *et al.* Biochemistry. 1988)、mRNA 合成を促進することで悪性腫瘍において oncogene として機能する eIF4E を阻害することから (Kentsis A. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2004)、悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果が注目されている。さらに近年、Ribavirin が p53 の経路を介してウイルスの複製を抑制するということや (Liu WL. *et al.* PLoS One. 2012)、乳癌や急性骨髄性白血病などの悪性腫瘍に対し、抗腫瘍効果を認めるとの報告もされている (Kentsis A. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2004, Borden KL. *et al.* Leuk Lymphoma. 2010, Assouline S. *et al.* Blood. 2009)。また、当教室からも、悪性神経膠細胞に対する細胞増殖抑制効果を報告している (Oncol Lett. 2014)。



Ribavirin. 組成式: C₈H₁₂N₄O₅、分子量: 244

構造的には核酸類縁体で、ウイルスの核酸複製を妨害するとされている。1970 年に合成され、開発が開始された。1990 年代になり C 型肝炎用に実用化されている。分子量が小さく脳血液関門を十分に通過すると考えられる。また、肝炎における定常期の血中濃度は 100 μM 以上に相当するが、10 μM でも細胞増殖抑制効果を示している (上述. Oncol Lett. 2014)。

2. 研究の目的

悪性神経膠腫、なかでも膠芽腫 (glioblastoma, WHO grade IV) は極めて難治性であり治療成績の改善は大きな課題である。現在、temozolomide (TMZ) が化学療法における標準治療薬として用いられているが、延命効果を示すものの満足すべき効果を約束するものではない。一方、Ribavirin は、核酸アナログであり抗ウイルス薬として、1972 年に Sidwell らがはじめて報告している。この Ribavirin が、乳癌や急性骨髄性白血病において、抗腫瘍効果を示すという報告が散見されている。また、当教室からもごく最近、悪性神経膠腫細胞株において細胞増殖抑制効果を示すことを報告してきた。そこで、Ribavirin の膠芽腫に対する臨床応用を目指し、さらなる知見の蓄積を目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

悪性神経膠腫細胞株を用いて、Ribavirin の増殖抑制効果、そして抗腫瘍効果の作用機序を解明する。さらに、TMZ + Ribavirin の 2 剤、TMZ + IFN- β + Ribavirin の 3 剤併用による効果を検討する。以上を念頭におき、以下方法を用いて検討した。

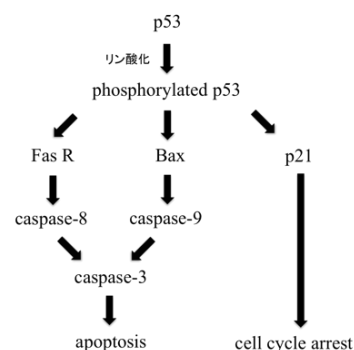
(1) 悪性神経膠腫細胞株 7 種類のヒト悪性神経膠腫細胞株、U-87MG、U-138MG (the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)、A-172、AM-38、T98G、U-251MG、YH-13 (Health Science Research Resources Bank, Sennan, Osaka, Japan) を用いた。

(2) 細胞増殖抑制試験 24 穴プレート (Iwaki) に 1×10^4 個の細胞を撒き、24 時間培養後に薬剤 [Ribavirin (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M)] を含む新鮮培地に交換、72 時間後に採取した細胞数を Coulter Counter (Coulter Counter Z1, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を用いて測定。

(3) FACS による解析 ① Apoptosis : Apoptosis の検出として、アポトーシス細胞の細胞膜に現れる phosphatidylserine に結合する Annexin V と細胞内に取り込まれ DNA と結合する PI を flow cytometry にて解析する方法が提唱されている。そこで、Ribavirin によりアポトーシスの誘導を flow cytometer (Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA) による Annexin V と PI の検出にて、経時的に解析した。② Cell cycle : 悪性神経膠腫細胞株を培養し、Ribavirin を投与後、経時的に PI の発現を FACS で測定し、細胞周期の解析を行った。

(4) Western-blotting による解析 Ribavirin による抗腫瘍効果と p53 との関係を検討するために、p53、phosphorylated p53、そして p53 pathway における重要な因子である p21、Bax、Fas-R、caspase-8、caspase-9、caspase-3 のタンパク発現を Western-blotting にて解析した。なお、Ribavirin 投与後、経時的な (0, 4, 8, 24, 48 時間後) 変化を観察した。

外因性 apoptosis : 細胞膜の受容体 death receptor : Fas-R
内因性 apoptosis : ミトコンドリア : Bax



(5) DNA の損傷の確認 p53 を活性化させる要因の一つに DNA double-strand breaks (DSBs) がある。DSBs は細胞に起こる多くの DNA 損傷のうち、最も危険なものとしてされている。DSBs により損傷された DNA のヒストン H2A バリエーション (H2AX) は、リン酸化 (γ H2AX) されて DNA 損傷部位に集積する (Lobrich M *et al.* Cell Cycle. 2010)。そこで、Ribavirin 投与後に γ H2AX を蛍光顕微鏡で観察した。一方、Ataxia telangiectasia mutated (ATM) は、DNA 損傷部位に起きた H2AX のリン酸化をいち早く認識し、自己リン酸化が誘導される。リン酸化された ATM は p53 を活性化させ、p53 pathway の下流シグナルを活性化すると考えられている。そこで、ATM、phosphorylated ATM のタンパク発現を Western-blotting にて解析した。

(6) TMZ 単剤投与群、TMZ + Ribavirin 2 剤併用投与群および、TMZ + Ribavirin + IFN- β 3 剤併用投与群の比較検討 細胞増殖抑制効果を検討するとともに、上記 FACS や Western-blotting による解析を行う。なお、併用による細胞増殖抑制効果が相乗効果であるかを評価するために、Chou Talalay method を用いて検討を加える (Chou TC. Pharmacol Rev. 2006)。

4. 研究成果

Ribavirin は 7 種類の悪性神経膠腫細胞株に対し、濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認めた。Flow cytometry による解析からは、Ribavirin の投与によりアポトーシスが誘導され、細胞周期にて G0/G1 への cell cycle arrest を誘導することが確認された (下図)。

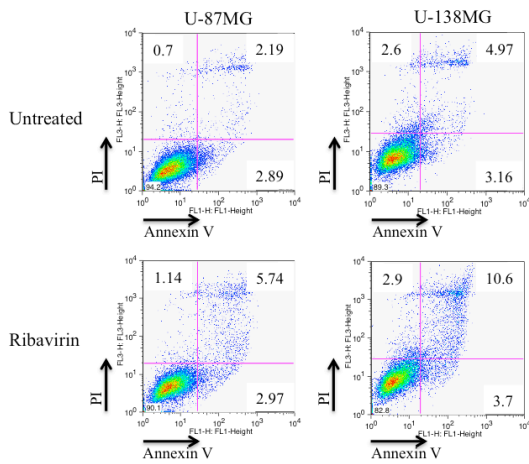


図. Ribavirin によるアポトーシスの誘導
2 種類の悪性神経膠腫細胞株を培養し、Ribavirin (10 μ M) 投与 72 時間後に Annexin V と PI の発現を FACS で測定した。U-87MG、U-138MG 共に Ribavirin (10 μ M) 投与により Annexin V と PI が両方とも検出される割合が増加し、後期アポトーシスが誘導されると考えられた。

Western-blotting による解析では phosphorylated p53 のタンパク発現の増強を認め、p53 の活性化が確認された。また、p53 の下流シグナルである p21、Bax、Fas、caspase-8、caspase-9、caspase-3 のタンパク発現の増強も認めた (下図)。

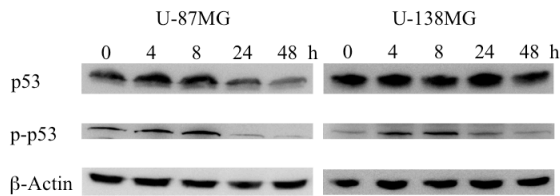


図. Ribavirin による p-53、phosphorylated p-53、p53 pathway signal のタンパク発現の変化
Ribavirin (10 μ M) 投与 0、4、8、24、48 時間後に、ウエスタンブロット法で p53、phosphorylated p53 (p-p53) のタンパク発現を観察した。U-87MG、U-138MG 共に Ribavirin (10 μ M) 投与にて、p-p53 のタンパク発現が増強した。

蛍光抗体法による観察では Ribavirin 投与により γ H2AX のドット状の集積が観察された。そして、Western-blotting による解析では ATM 及び phosphorylated ATM のタンパク発現の増強を認めた (下図)。

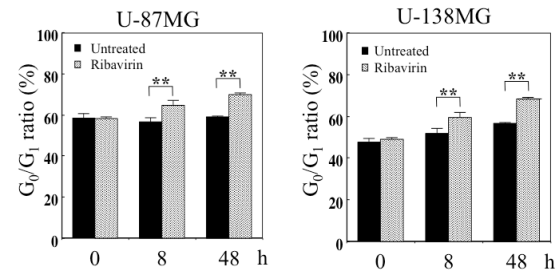
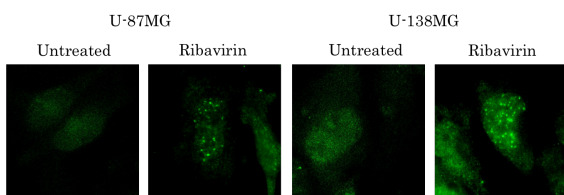


図. Ribavirin による cell cycle の変化
Ribavirin (10 μ M) 投与 8、48 時間後に PI の発現を FACS で測定し、細胞周期の解析を行った。U-87MG、U-138MG いずれの細胞も Ribavirin (10 μ M) 投与にて G0/G1 期の割合が増加する傾向があった。

両図ともに、Oncol Rep 39: 537-544, 2018 より (一部改定)。

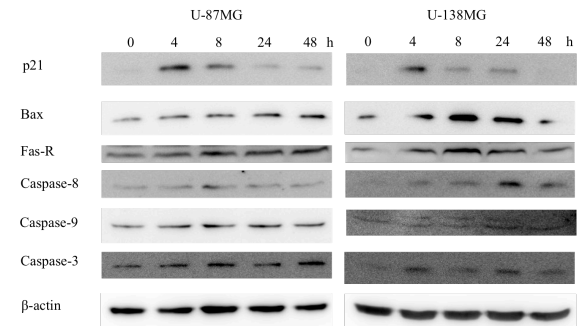


図. p21、Bax、Fas-R、Caspase-8、caspase-9、caspase-3 は U-87MG、U-138MG 共に、Ribavirin 投与 4 時間後にタンパク発現の増強を認めた。

ともに、Oncol Rep 39: 537-544, 2018 より (一部改定)。

図. γ H2AX の蛍光顕微鏡による DSBs の観察
Ribavirin (10 μ M) 投与 4 時間後に γ H2AX を蛍光顕微鏡で観察した。U-87MG、U-138MG どちらの細胞株においても、核内に γ H2AX の集積が観察された。

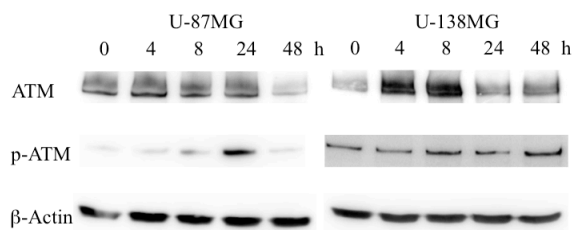


図. Ribavirin による ATM、phosphorylated ATM のタンパク発現の変化

ATM は U-87MG、U-138MG 共に、Ribavirin を投与 4 時間後にタンパク発現が増強した。また、p-ATM は U-87MG、U-138MG 共に、Ribavirin を投与後タンパク発現が増強し続ける傾向を認めた。

Oncol Rep 39: 537-544, 2018 より (一部改定)。

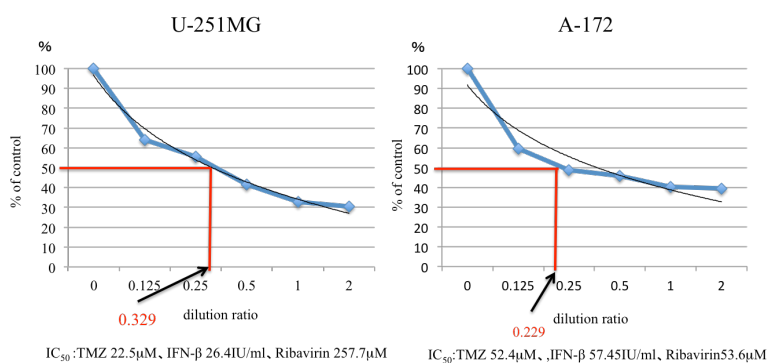
以上より、悪性神経膠腫細胞株に対して、Ribavirin は、DSBs を引き起し、ATM が自己リン酸化、そして p53 を活性化すると考えられた。さらに活性化された p53 は、p21 を活性化し cell cycle arrest を誘導するとともに、Bax、caspase-9 を活性化し内因性アポトーシス、及び Fas R、caspase-8 を活性化し外因アポトーシスを誘導することにより抗腫瘍効果を示すものと考えられた。

Ribavirin 単剤と Ribavirin + TMZ + IFN-β の 3 剤併用との細胞増殖抑制効果の検討において、悪性神経膠腫細胞株で、3 剤併用による細胞増殖抑制効果の増強を認めた。

一方、TMZ 単剤、TMZ + IFN-β、及び TMZ + IFN-β + Ribavirin による細胞増殖抑制効果の比較では、U-87MG、U-138MG、YH-13 の 3 種類の細胞株において、TMZ + IFN-β + Ribavirin の 3 剤併用投与群は、TMZ 単剤投与群ならびに TMZ + IFN-β の 2 剤併用投与群と比較して、有意に細胞増殖抑制効果が増強した。

また A-172、AM-38、T98G、U-251MG の 4 種類において、TMZ + IFN-β + Ribavirin の 3 剤併用投与群は、TMZ 単剤投与群と比較して有意に細胞増殖抑制効果が増強し、TMZ + IFN-β の 2 剤併用投与群との比較においても、細胞増殖抑制効果が増強する傾向がみられた。

なお、TMZ + IFN-β + Ribavirin の 3 剤併用による細胞増殖抑制効果が相乗効果であるかを評価するために、Chou Talalay method (Pharmacol Rev. 2006) を用いて 3 剤併用による CI を算出した。CI は、A-172 では 0.68 (CI < 1.00)、U-251MG には 0.98 (CI < 1.00) であり、3 剤併用での抗腫瘍効果は相乗効果と判断された。



Chou Talalay method を用いて 3 剤併用による CI を算出した。今回の検討では、50%細胞増殖抑制時の CI を算出するため、TMZ、IFN-β、Ribavirin のそれぞれで IC₅₀ 値が得られている 2 種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、U-251MG) を使用した。TMZ + IFN-β + Ribavirin 3 剤併用時の CI は A-172 においては 0.68 (CI < 1.0)、U-251MG においては 0.98 (CI < 1.0) であった。

以上より、Ribavirin を TMZ、IFN-β と併用することで悪性神経膠腫細胞株に対して相乗効果による抗腫瘍効果の得られることが示された。

まとめ 本研究により、Ribavirin が悪性神経膠腫細胞株に対し抗腫瘍効果を認めることが示された。その作用機序は Ribavirin による DSBs の誘導により、p53 pathway が活性化するものと考えられた。さらに、Ribavirin を TMZ と IFN-β と併用することで悪性神経膠腫細胞株に対し抗腫瘍効果が増強され、この増強作用が相乗効果であることが示された。今後、Ribavirin が臨床応用されることが期待される。

<引用文献>

主なもののみ

- ① Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T, Fukushima T: Treatment of low-grade diffuse astrocytomas by surgery and human fibroblast interferon without radiation therapy. J Neuro-Oncology 61: 171-176, 2003.
- ② Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Fukaya C, Yamamoto T: Human interferon beta, nimustine hydrochloride, and radiation therapy in the treatment of newly diagnosed malignant astrocytomas. J Neuro-Oncology, 72: 57-62, 2005.
- ③ Yamamuro S, Sano E, Okamoto Y, Ochiai Y, Ohta T, Ogino A, Natsume A, Wakabayashi T, Ueda T, Hara H, Nakayama T, Yoshino A, Katayama Y: Antitumorigenic effect of interferon- β by inhibition of undifferentiated glioblastoma cells. Int J Oncol 47: 1647-1654, 2015.
- ④ Ogino A, Sano E, Ochiai Y, Yamamuro S, Tashiro S, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Okamoto Y, Tsumoto K, Ueda T, Yoshino A, Katayama Y. Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines. Oncol Lett 8: 2469-2474, 2014.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- 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. Oncol Rep. 2018 Feb;39(2):537-544. doi: 10.3892/or.2017.6149. Epub 2017 Dec 11.
査読有り

他、投稿予定あり.

[学会発表] (計2件)

- ① 山室 俊、小澤 祥成、八木 千裕、龍岡 樹里、花島 裕也、吉村 相大、角 光一郎、佐野 恵海子、上田 卓也、吉野 篤緒、未分化状態のヒト悪性神経膠腫細胞株は indoleamine 2,3-dioxygenase を高発現している、第36回日本脳腫瘍学会学術集会、神奈川、2018.12
- ② 花島 裕也、佐野 恵海子、龍岡 樹里、吉村 相大、山室 俊、角 光一郎、原 弘之、上田 卓也、吉野 篤緒、Lenalidomide における悪性神経膠腫細胞株への作用、第36回日本脳腫瘍学会学術集会、神奈川、2018.12

6. 研究組織

研究分担者指名：荻野 暁義

ローマ字氏名：(OGINO, akiyoshi)

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号：90459876