

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11731

研究課題名(和文)mGluR5特異的経口阻害剤RG7090による口腔癌の転移抑制療法の開発

研究課題名(英文)Effect of a novel orally bioavailable mGluR5 inhibitor, RG7090, on the metastasis of oral cancer cells

研究代表者

栗林 伸行(kuribayashi, nobuyuki)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80617332

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)：mGluR5 特異的新規経口阻害剤であるRG7090にて有意な結果は得られなかったが、低侵襲かつ持続的に抑制することのみに着目し、上流に存在する CXCR4 における新規経口阻害剤である AMD 070 に着目し研究を継続した。結果、AMD 070 の経口投与がわずかな白血球の増加を観察したが血球系に著明な変化を認めなかった。また、SDF-1 誘導性の足場非依存性の増殖は、AMD070 処理により有意に抑制された。さらに、B88-SDF-1 細胞をヌードマウス静脈内に移植し、AMD070 投与したマウスは、B88-SDF-1 細胞の肺転移を有意に抑制していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、mGluR5 特異的経口阻害剤での有意な結果は得られなかったが、その上流の CXCR4 特異的経口阻害剤による転移抑制効果および有害事象について確認し、新規経口阻害剤が、SDF-1/CXCR4システムを介した口腔癌の転移を、低侵襲かつ持続的に抑制できる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We could not demonstrate significant results with a novel orally bioavailable mGluR5 inhibitor, RG7090 on the metastasis of oral cancer cells. However, we focus only on minimally invasive and persistent control, continued our study with AMD 070, a novel oral inhibitor of CXCR4 that is upstream of mGluR5. Mice administered with AMD 070 did not exhibit any side effects, such as hematotoxicity, allergic reactions or weight loss. Although treatment with AMD070 did not affect the anchorage-dependent growth of B88-SDF-1 cells, it significantly suppressed the anchorage-independent growth. Moreover, we performed an experimental therapy using AMD070 to prevent the distant metastasis of B88-SDF-1 cells in vivo. Daily oral administration of AMD070 significantly inhibited the lung metastasis of B88-SDF-1 cells in nude mice.

研究分野：外科系歯学

キーワード：mGluR 5 CXCR 4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の予後不良因子は転移である。当研究室では転移抑制療法の開発を目指し、口腔癌の転移機構について研究を行ってきた。その中で、ケモカインレセプターCXCR4 を発現している口腔癌細胞がリンパ節間質で産生されるリガンドstromal cell-derived factor (SDF)-1 に引き寄せられながらリンパ節転移を起こすこと(Exp Cell Res 290:289, 2003; Lab Invest 84:1538, 2004; Int J Oncol 25:65, 2004; Int J Oncol 29:1133, 2006)、CXCR4 を高発現している口腔癌細胞の転移がCXCR4 阻害剤により抑制できることを明らかにしてきた(Mol Cancer Res 5:1, 2007; Mol Cancer 8:62, 2009; Eur J Cancer 47:452 2011)。これら一連の結果は、CXCR4 阻害剤による口腔癌の転移抑制療法の可能性を示唆するものである。しかしながら、CXCR4 阻害剤は近年、造血幹細胞の動員薬として米国で臨床応用されており(Pharmacol Ther 128:509, 2010)、正常マウスに長期間投与した場合、慢性的な白血球増多症を誘発した(PLoS One 8:e80773, 2013)。そこで、われわれは、cDNA マイクロアレイにより血球系細胞に発現のない癌細胞特異的なCXCR4の標的分子を網羅的に検索した。その結果、CXCR4 システムの下流に存在する転移関連候補分子として、metabotropic glutamate receptor(mGluR) 5 を同定した。mGluR5 は、グルタミン酸を唯一のリガンドとする代謝型グルタミン酸受容体の一つであり、神経系の細胞で高発現しているが、血球系細胞では発現していない(Histochem Cell Biol 132:435, 2009)。実際、mGluR5 特異的阻害剤を正常マウスに連日投与しても血液毒性は認めなかった(PLoS One 8:e80773, 2013)。さらにわれわれは、mGluR5 特異的阻害剤であるMPEP; 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine hydrochlorideおよびMTEP;3-((2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl)pyridineがCXCR4 システム依存的な口腔癌細胞の遊走を有意に抑制すること(PLoS One 8:e80773, 2013)、ヌードマウス転移モデルにおけるリンパ節転移および肺転移を有意に抑制することを明らかにした(PLoS One 8:e80773, 2013)。しかしながら、mGluR5特異的阻害剤であるMPEP およびMTEP は連日腹腔内もしくは静脈内投与を必要とすることから(J Pharmacol Exp Ther 339:474, 2011; Epilepsia 3:24, 2010)、将来的な臨床応用を考えた場合、患者への精神的負担が大きく、さらに医療従事者の専門的手技を必要とするため実用的ではない。最近、新規mGluR5 特異的経口阻害剤であるRG7090 (Basimglurant, RO4917523; 2-chloro-4-[1-(4-fluoro-phenyl)-2,5-dimethyl-1H-imidazol-4-ylethynyl]-pyridine) が開発され、グルタミン酸による過剰な刺激が原因でおこる大鬱病障害や脆弱性X症候群において、その有用性が報告されている(Curr Opin Pharmacol 28:254, 2015; Expert Opin Investig Drugs 24:1247, 2015)。RG7090 はmGluR5 のnegative allosteric modulatorであり、MPEP、MTEP に比べ半減期が長いため、隔日での経口投与が可能であり、mGluR5 をより低侵襲かつ持続的に抑制することができる(J Pharmacol Exp Ther 353:213, 2015; J Pharmacol Exp Ther 350:212, 2014)。

## 2. 研究の目的

本研究ではCXCR4 システムを介した口腔癌の転移に対し、RG7090 が新規経口阻害剤となりうるか否かを検討することを目的とした。

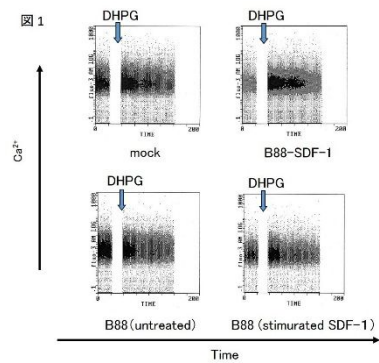
## 3. 研究の方法

まず、CXCR4 と mGluR5 を高発現している高転移性口腔癌細胞 B88-SDF-1 に対して、RG7090 が mGluR5 の機能抑制に及ぼす影響を検討した。同様に親株 B88 を SDF-

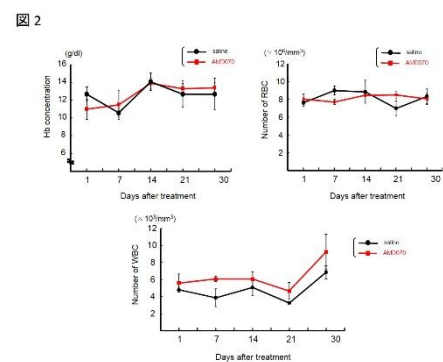
1 処理した条件でも検討した。RG 7090 において機能的発現抑制を認めなかったため、野生型マウス (C3H/HeN) を用いて、CXCR 4 特異的阻害剤である AMD070 投与後における有害事象の有無を検討した。B88-SDF-1 細胞を用いて、AMD070 が足場依存的あるいは非依存的な増殖に及ぼす影響を検討した。B88-SDF-1 細胞を用いて、AMD070 が SDF-1 誘導性の細胞遊走と細胞浸潤に及ぼす影響を検討した。B88-SDF-1 細胞を同所性移植あるいは静脈内移植したヌードマウスに、経口投与を行い、転移抑制能を検討した。

#### 4. 研究成果

mGluR5 の特異的作動薬である DHPG((S)-3,5-DHPG) (20 $\mu$ M) で B88-SDF-1 細胞および SDF-1 処理後の親株 B88 細胞を刺激すると、Ca flux assay にて早期に細胞内 Ca 濃度の上昇を認めた (図 1) が、Lindemann らにより報告されている 10nM の RG7090 にて処理し、DHPG 刺激後のカルシウム流入量の抑制を評価したが抑制されなかった。濃度を変更して評価してみたものの明らかな抑制を認めず、機能的発現抑制が認められ

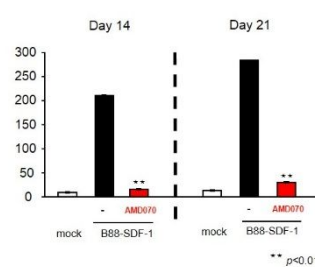


なかつた。そこでわれわれは、慢性的な白血球増多症を誘発するが、低侵襲かつ持続的に抑制することのみに着目し、CXCR4 新規経口阻害剤である AMD 070 に着目し研究を継続した。AMD 070 は X4 指向型ヒト免疫不全ウイルス 1 型に対する CXCR4 特異的 阻害剤 (半減期: 7.6-12.6 時間) であり、経口分割投与が可能である。結果として、まず、野生型マウス (C3H/HeN) に対し、AMD070



を 1 か月間経口投与したところ、control と比較して体重、ヘモグロビン濃度、赤血球数に著明な変化を認めなかった。しかしながら、わずかな白血球の増加を観察したが体制に影響はないと考えられた (図 2)。

図 3



SDF-1 誘導性の足場非依存性の増殖は、AMD070 処理 (6.6 $\mu$ M) により有意に抑制された (図 3) 。また、SDF-1 誘導性の細胞遊走は、CXCR4 特異的阻害剤である AMD3100 および AMD070 処理により有意に抑制された (図 4) 。次いで、B88-SDF-1 細胞をヌードマウス静脈内に移植し、CXCR4 特異的阻害剤である AMD070 (2.0mg/kg) 投与したマウスでは、B88-SDF-1 細胞の肺転移は有意に抑制していた (図 5) 。結果、mGluR5 特異的経口阻

図 4

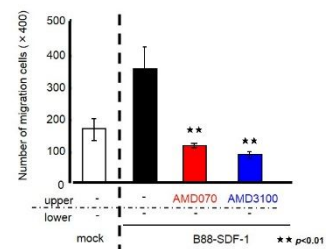
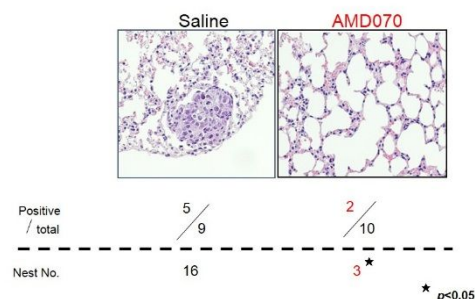


図 5



害剤での有意な結果は得られなかったが、その上流の CXCR4 特異的経口阻害剤による転移抑制効果および有害事象について確認し、新規経口害剤が、SDF-1/CXCR4 システムを介した口腔癌の転移を、低侵襲かつ持続的に抑制できる可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Uchida D, Kuribayashi N, Kinouchi M, Sawatani Y, Shimura M, Mori T, Hasegawa T, Miyamoto Y, Kawamata H. | 4. 巻<br>40            |
| 2. 論文標題<br>Effect of a novel orally bioavailable CXCR4 inhibitor, AMD070, on the metastasis of oral cancer cells. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Oncol Rep   | 6. 最初と最後の頁<br>303-308 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3892/or.2018.6400   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>9Kuribayashi N, Uchida D, Hamasaki Y, Kawamata H.                        | 4. 巻<br>48              |
| 2. 論文標題<br>Oral squamous cell carcinoma arising in a patient with Werner syndrome. | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Int J Oral Maxillofac Surg   | 6. 最初と最後の頁<br>1394-1397 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.ijom.2019.06.005                              | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kuribayashi N, Uchida D, Kinouchi M, Kuribayashi K, Hasegawa T, Yagisawa S, Kawamata H:                |
| 2. 発表標題<br>Effect of a novel orally bioavailable CXCR4 inhibitor, AMD070, on the metastasis of oral cancer cells. |
| 3. 学会等名<br>American Association for Cancer Research 107th Annual Meeting  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>栗林伸行, 木内 誠, 内田大亮, 川又 均           |
| 2. 発表標題<br>口腔癌の転移における新規経口CXCR4阻害剤AMD070の有効性 |
| 3. 学会等名<br>第28回日本口腔内科学会, 第31回日本口腔診断学会合同学会   |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-------|--|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 木内 誠<br><br>(kinouchi makoto)<br><br>(00759483)  | 獨協医科大学・医学部・助教<br><br><br>(32203)  |    |
| 研究分担者 | 内田 大亮<br><br>(utida daisuke)<br><br>(20335798)   | 獨協医科大学・医学部・准教授<br><br><br>(32203) |    |
| 研究分担者 | 川又 均<br><br>(kawamata hitoshi)<br><br>(70224847) | 獨協医科大学・医学部・教授<br><br><br>(32203)  |    |