

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20010

研究課題名(和文) 抗VEGF抗体ベバシズマブによる膠芽腫での代謝リモデリングの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Metabolic remodeling of glioblastoma by vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitor Bevacizumab

研究代表者

田中 宏知 (Tanaka, Hirotomo)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10569239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモデルにベバシズマブを投与すると、ピルビン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、グルタミンの低下を認め、グルタミナーゼ(GLS)阻害剤でも、クエン酸、ピルビン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、グルタミン、乳酸の低下を認めた。ベバシズマブとGLS阻害剤との併用では、著明なグルタミンの低下、乳酸、ピルビン酸の低下を認め、TCA回路内代謝物の多くが抑制されていた。U87においてはベバシズマブとGLS阻害剤との併用で細胞の増殖は抑制された。In vivoでは、ベバシズマブ投与によりU87移植ヌードマウスの生存は有意に延長したが、GLS阻害剤との併用では更なる延長効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In vivo experiment, citrate was increased, and pyruvate, succinate, fumarate, malate, and glutamine were decreased by Bevacizumab treatment in the tumors. By the treatment of Glutaminase(GLS) inhibitor, citrate, pyruvate, succinate, fumarate, malate, glutamine, and lactate were decreased in the tumors. By the treatment of both Bevacizumab and GLS inhibitor, citrate, pyruvate, succinate, fumarate, malate, glutamine, and lactate were decreased. Dual treatment induced significant inhibition of TCA cycle. In vitro experiment, U87 cell proliferation was inhibited by dual treatment (bevacizumab + GLS inhibitor). Finally, in vivo experiment, Bevacizumab treatment had significant longer survival than control. However, dual treatment (Bevacizumab and GLS inhibitor) did not have longer survival than Bevacizumab alone.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma VEGF metabolic

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は原発性脳腫瘍で最も悪性の腫瘍の1つで、集学的治療を施行しても生存期間中央値は2年以下である。現在の標準的治療は、可及的摘出後に放射線併用テモゾロミド+ベバシズマブ療法を行う方法である。ベバシズマブは VEGF(vascular endothelial growth factor)に対するヒトモノクローナル抗体で、血管新生を抑制して腫瘍血管を正常化させ、腫瘍を兵糧攻めにする治療薬であり、本邦では2013年より使用できるようになった。しかし、その効果は限定的と言われている。ベバシズマブにより、MRI上、膠芽腫の造影部位は縮小し、浮腫も劇的に軽減するものの、数か月後には極めて悪性の状態で再発を来し、高度の治療抵抗性を獲得していることが多い。ベバシズマブにより血管透過性が低下して造影領域の縮小が生じる pseudoresponse (偽反応) という現象が起こっているとの報告がある一方で、メチオニン PET やコリン PET などベバシズマブの投与後にその up-take が低下し、生物学的 activity が低下しているとの報告もあり、ベバシズマブ投与による膠芽腫への影響はまだ十分解明されていない。

膠芽腫では、The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトにより、上皮成長因子受容体 (EGFR) の増幅や変異など、その機能亢進が極めて特徴的で、EGFR の下流の PI3K-Akt-mTOR 経路の活性化により Warburg 効果を主とする代謝リモデリングが起こり、膠芽腫の進展、生存、治療抵抗性に大きく寄与している。グリオーマ細胞では、グルコースの取り込みが亢進しているだけでなく、グルタミン取り込みも亢進しており、さらに、活性酸素の処理に関わるグルタチオン産生を亢進させるため、シスチンなどを過剰に取り込んでいる。これまで、ベバシズマブ投与による代謝変化についての詳細な報告は無いが、Keunen らは、anti-VEGF 治療により血流が低下して、HIF1 の上昇及び解糖系の亢進が生じ、浸潤能が亢進したことを報告している。

申請者の研究室では、グリオーマにおけるグルタミン代謝について以前より解析しており、mTOR 阻害薬にてグルタミン代謝が亢進し、グルタミン代謝を抑制することで、グリオーマに対する相乗的な抗腫瘍効果が得られたことを今年報告した。(Tanaka, J Clin Invest. 2015 Apr;125(4):1591-602)

しかし、ベバシズマブ投与後のグリオーマ細胞内のメタボローム解析についてはこれまであまり報告は無い。また、ベバシズマブ投与とグルタミン代謝との関連を調べた報告もほとんどない。もしベバシズマブ投与による代謝リモデリングが明らかとなれば、その代謝経路を抑制することで、ベバシズマブ治療の相乗効果および悪性転化阻害が得られる可能性もある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ベバシズマブ投与によるグリオーマ細胞内の代謝変化について明らかにするとともに、ベバシズマブ投与による代謝リモデリングを明らかにして、それをターゲットとした治療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

(1) ベバシズマブ(Bev)を U87 培養細胞に投与し、48 時間後に回収し、ガスクロマトグラフィー/質量分析器(GC/MS)にてメタボローム解析を行う。また、グルタミナーゼ阻害剤(GLSi)を併用して同様の解析を行う。

(2) ベバシズマブ(Bev)を U87 培養細胞に投与し、細胞増殖アッセイを行う。また、グルタミナーゼ阻害剤(GLSi)を併用して同様の解析を行う。

(3) グリオーマ培養細胞 U87 をヌードマウス脳内に  $1 \times 10^6$  個移植して腫瘍の生着を確認した後、ベバシズマブをヌードマウスに静脈内投与する。また、GLSi は腹腔内投与する。(bevacizumab は 10mg/kg を週 2 回 尾静脈から静注、GLSi は 5mg/kg を 2 日に 1 回 腹腔内投与)その後、グリオーマ移植腫瘍を取り出し、ガスクロマトグラフィー/質量分析器(GC/MS)にてメタボローム解析を行う。また、マウスの生存期間を解析する。

### 4. 研究成果

(1) U87 培養細胞にベバシズマブを投与すると、グルコース、ピルビン酸、乳酸、グルタミンの低下を認めた。GLS 阻害剤を投与すると、グルタミン、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、クエン酸の低下を認めた。ベバシズマブと GLS 阻害剤の併用では、グルタミン、クエン酸の低下を認めた。(Fig.1)

(2) マウス移植腫瘍に対してベバシズマブを投与すると、乳酸の低下は見られず、クエン酸の上昇、ピルビン酸、グルタミンの低下を認めた。GLS 阻害剤では、グルタミン、ピルビン酸、乳酸の低下を認め、ベバシズマブと GLS 阻害剤との併用では、グルタミン、乳酸、ピルビン酸の低下を認めた。(Fig.2)

(3) グリオーマ培養細胞にベバシズマブ、GLS 阻害剤を投与して 48 時間後の細胞数をカウントすると、U87 においては著明に細胞数が低下していた。その他の細胞ではベバシズマブおよび GLS 阻害剤による増殖抑制効果は少なかった。(Fig.3)

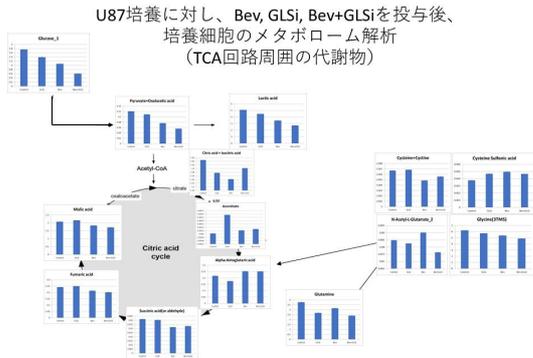
(4) U87 細胞を脳内移植したマウスにベバシズマブおよび GLS 阻害剤で治療し、体重および摘出腫瘍サイズ、生存期間を解析すると、腫瘍増大により、摂食困難となるためコントロー

ル群、GLSi 群では著明な体重減少を認め、腫瘍はコントロール、GLSi 単独群では大きく、Bev 単独、Bev+GLSi 群では腫瘍は有意に小さかった。(Fig.4)

(5) また、生存期間は、ペバシズマブ単独およびペバシズマブ+GLS 阻害剤投与群で有意にコントロールに比較して延長したが、GLS 阻害剤単独では有意な延長効果は認めなかった。(Fig.5)

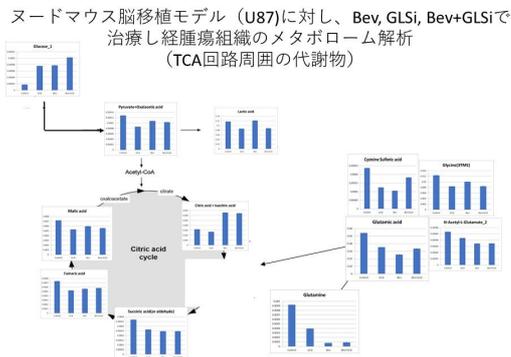
**考察：**

以上の結果より、ペバシズマブを投与することでグルタミンの代謝物の量が低下し、グルタミン代謝のリモデリングが生じているものと思われる。グルタミナーゼ(GLS)阻害剤を併用することでさらにグルタミン代謝を抑制し、抗腫瘍効果を期待したが、ペバシズマブとGLS 阻害剤との併用での相乗的な抗腫瘍効果は得られなかった。ペバシズマブ自体が血流供給抑制作用があるため、ケトン代謝を中心とした脂質代謝との関連で併用薬剤を模索することも必要と思われる。



U87培養に対し、Bev, GLSi, Bev+GLSiを投与後、培養細胞のメタボローム解析 (TCA回路周囲の代謝物)

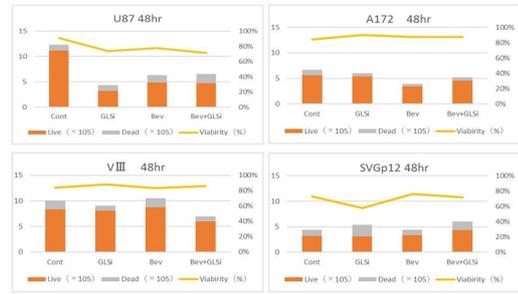
TCA回路周囲の代謝物はクエン酸、グルタミン、グルタミン酸の低下も認めた。また、グルコース、乳酸もBevの投与により低下を認めた。



ヌードマウス脳移植モデル (U87)に対し、Bev, GLSi, Bev+GLSiで治療し経腫瘍組織のメタボローム解析 (TCA回路周囲の代謝物)

TCA回路周囲の代謝物はクエン酸は上昇し、すべて低下した。グルタミン、グルタミン酸の低下を認めた。乳酸はBevを投与しても有意な低下は認めず。

**グリオーマ細胞にBevとGLSiを投与し細胞増殖能を解析**



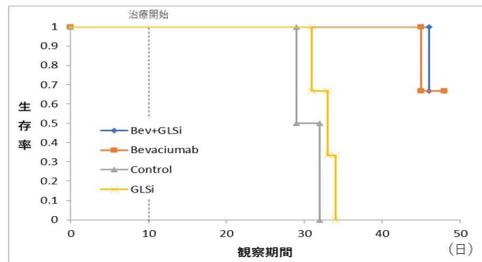
U87では、コントロール群に比べ、Bev, GLSi投与群で細胞増殖抑制効果が著明であったが、その他の細胞株では明らかな増殖抑制効果はみられなかった。また、Bev, GLSiの併用での相乗効果は認めなかった。

**ヌードマウス脳移植モデル (U87細胞) にBev, GLSiを投与して平均体重と摘出脳の比較**

	n	Day 14	Day 20	Day 28		
Control	4	26.9	25.9	18.8		
GLSi	5	26.3	24.1	21.3		
Bev	5	25.8	25.8	26.5		
Bev+GLSi	5	26.8	25.1	25.8		

- ・コントロール群、GLSi群では著明な体重減少を記録 (腫瘍増大により、摂食困難となるため)
- ・腫瘍はコントロール、GLSi単独群では大きく、Bev単独、Bev+GLSi群では腫瘍は有意に小さかった。

**ヌードマウス脳移植モデル (U87細胞) にBev, GLSiを投与して生存期間を比較**



- ・Bev投与群では生存期間の延長が有意であった
- ・GLSi群ではコントロールに比較しわずかにGLSi群で生存の延長を認めた。
- ・Bev, GLSiの併用群が最も生存期間が長かったが、Bev単独と有意差なし。

**5. 主な発表論文等**

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Rapid tumor growth with glial differentiation of central neurocytoma after stereotactic radiosurgery. Tanaka H, Sasayama T, Yamashita H, Hara Y, Hayashi S, Yamamoto Y, Fujita Y, Okino T, Mizowaki T, Yamaguchi Y, Tanaka K, Kohmura E. J Clin Neurosci. 2016 Sep;31:188-92. doi: 10.1016/j.jocn.2016.01.036

Tumor-Associated Macrophages Associate with Cerebrospinal Fluid Interleukin-10 and Survival in Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL). Sasayama T, Tanaka K, Mizowaki T, Nagashima H, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, Mizukawa K, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. Brain Pathol. 2016 Jul;26(4):479-87. doi: 10.1111/bpa.12318

A 39-Year-Old Female with cerebellar tumor, cervical cord lesion and visual disturbance. Hiroto Tanaka, Daisuke Yamamoto, Katsu Mizukawa, Akiyasu Kanamori, Norio Chihara, Ryosuke Matsuoka, Shigeo Hara, Takanori Hirose, Takashi Sasayama, Eiji Kohmura, Brain Pathology, 2018 (in press)

Embryonal brain tumor with unknown primary lesion and massive cerebrospinal fluid dissemination: a case report. Hiroto Tanaka, Daisuke Yamamoto, Mitsuru Ikeda, Masashi Morikawa, Kayo Ueda, Takashi Sasayama, Eiji Kohmura., Journal of clinical neuroscience, 2018 (in press)

〔学会発表〕(計 8 件)

田中宏知、森川雅史、池田充、岩橋洋文、井村隼、上田佳世、山本大輔、篠山隆司、甲村英二、広範な髄腔内播種を認めた中枢神経胎児性腫瘍の1例、第35回日本脳腫瘍病理学会、2017

田中宏知、井村隼、岩橋洋文、上田佳世、池田充、森川雅史、篠山隆司、多彩な組織像を呈した悪性グリオーマの1例、第112回近畿脳腫瘍病理検討会、2017年

田中宏知、井村隼、池田充、森川雅史、甲村英二、髄膜腫術後に生じた静脈性梗塞の検討、第22回日本脳腫瘍の外科学会、2017年

Hiroto Tanaka, Takashi Sasayama, Masamitsu Nishihara, Masashi Morikawa, Mitsuru Ikeda, Kazuhiro Tanaka, Eiji Kohmura, Survival benefit of antiepileptic drugs in patients with glioblastoma, 22nd annual scientific meeting and education day of the society for neuro-oncology, 2017年

田中宏知、岩橋洋文、池田充、森川雅史、著明な髄腔内播種を認めた脳腫瘍の1例、第110回近畿脳腫瘍病理検討会、2016年

田中宏知、岩橋洋文、池田充、森川雅史、甲村英二、ViewSite チューブリトラクターを用いたナビゲーションガイド下腫瘍生検術、第

21 回日本脳腫瘍の外科学会、2016年

田中宏知、岩橋洋文、池田充、森川雅史、甲村英二、1.5 および 3.0 テスラ MRA における生理学的静脈洞描出の頻度、日本脳神経外科学会第 75 回学術集会、2016 年

森川雅史、田中宏知、岩橋洋文、池田充、甲村英二、未破裂動脈瘤クリッピング術における術中 64 列 CT アンギオの画質向上の工夫、日本脳神経外科学会第 75 回学術集会、2016 年

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
田中宏知 (TANAKA hirotomo)  
神戸大学, 医学(系)研究科(研究院)  
医学研究員  
研究者番号: 10569239

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者 ( )