

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08304

研究課題名(和文)mTORシグナルを標的とした悪性グリオーマに対する新規化学療法の基盤構築

研究課題名(英文)Foundation of chemotherapy for malignant glioma targeting mTOR

研究代表者

江田 岳誉(EDA, TAKEYOSHI)

新潟大学・医歯学総合病院・薬剤師

研究者番号：90772038

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、GBMの増殖を制御するような薬剤の探索を試み、抗菌薬クリンダマイシン(CLD)が、細胞の生存率低下に関わることを確認した。しかし、その作用についての理解は不十分である。機序について調べるとCLDは上記抗腫瘍効果に沿うようにして、mTOR下流シグナルp70S6K、S6Kのリン酸化をそれぞれ用量依存的に制御した。CLDによる増殖抑制作用はまた、TMZとの併用投与によって強化された。マウス皮下腫瘍モデルでCLDとTMZ併用の効果は検証し、腫瘍の増殖は顕著に抑制された。CLDがmTOR経路を介したシグナル制御によりTMZ作用を感化し、抗腫瘍効果を増強するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CLDはGBM細胞に対し、高い抗腫瘍効果を示した。mTOR制御がその機序と考える。in vivo実験では、CLDとTMZ併用による作用を検証し、腫瘍は縮小を維持した。腫瘍制御におけるmTOR抑制については、フィードバック機構の存在が知られ、再発に関与するとされるが、CLDはTMZとの併用によりこれを回避している。GBM治療に重要な知見を提示する。GBM治療への応用の際、CLDは既存薬であることから、ヒトでの安全性が確保されている。また、従来の抗悪性腫瘍薬とは作用機序も異なるため、骨髄抑制など強力な副作用を回避できる。薬価は分子標的薬と比べると安価で、医療費削減の一助となるなど意義は大きい。

研究成果の概要(英文):Glioblastoma (GBM) accounts for the majority of primary brain tumors. Multimodal therapy such as surgical removal, radiotherapy, and temozolomide (TMZ) chemotherapy is performed, whereas the prognosis is still poor. There is an urgent need to develop effective chemotherapy. In primary assessment, we performed a screened for drugs that regulated the proliferation and differentiation against GBM cell lines. Approved macrolides, clindamycin (CLD) reduced cell viability in cultures. Here, we demonstrated that CLD regulated the proliferation of GBM. CLD attenuated the phosphorylation of p70S6K in a dose dependent manner. These effects were synergistically enhanced by the combination with CLD and TMZ. In vivo experiment, repeated administration of CLD and TMZ suppressed tumor growth. These results indicate that CLD shows synergistic activity and sensitization in combination with conventional chemotherapy in xenografts.

研究分野：神経薬理学

キーワード：Glioblastoma mTOR xenograft drug repositioning

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍全国集計調査 2001-2004 によれば、膠芽腫の生存期間中央値は 5 年生存率で 10.1%と極めて予後が不良である。標準治療として、手術による可及的摘出と放射線療法およびテモゾロミド (TMZ) 化学療法による集学的治療が導入される。しかしながら、膠芽腫には高い浸潤能や様々なストレスに適応して生存しようとする耐性機構が備わるため、再発を免れることはできない。新たな治療法の確立が急務とされる。

mTOR は栄養センサーとしてグルコースやアミノ酸などの栄養源を感知し、細胞の分化、増殖において中心的役割を担う。mTOR はまた、成長因子などによって活性化を受け、4EBP や S6K といった下流シグナルのリン酸化を介して翻訳を促す。これまでに網羅的ゲノム解析が実施され、GBM 細胞内には 3 つのがん化機構が作動していることが示されている。MAPK 経路と PI3K-Akt 経路が一体となったもの、Rb 経路そして p53 経路の異常である。これらのシグナル経路は独立して動いている訳ではなく、互いに連携しているとされる。その中で、多くの腫瘍で認める PI3K-Akt 経路の遺伝子異常の多くは mTOR の活性化を誘導することから、mTOR シグナルは腫瘍増殖の観点から重要な役割を担う。

このような背景のもと、PI3K-Akt 経路の遺伝子異常に着眼し、GBM の制御を目的とする mTOR 活性抑制物質の探索を試みた。その候補となる物質はドラッグ・リポジショニングを念頭におき、国内承認薬の中から選定した。その結果、抗菌薬クリンダマイシン (CLD) は GBM 細胞株において、分化増殖を顕著に抑制することを確認した。CLD と TMZ の併用についても抗腫瘍効果の増強を確認している。この研究で新たな適応やそのメカニズムを認めることができれば、その有用性は高い。CLD は、既存の抗生剤として臨床使用されており、すでに安全性が確保されている薬剤である。従来の抗がん剤のような骨髄抑制や殺細胞作用に基づく強力な副作用を回避できる可能性もある。しかしながら、CLD が関与した細胞毒性のメカニズムについての理解は不十分である。

2. 研究の目的

GBM は複数の治療抵抗因子を有するため、その制御は重要課題である。本研究の目的は GBM に対する効果的な薬物療法の基盤を確立することである。先行実験において、CLD は GBM 細胞株に対する抗腫瘍効果を示した。新たな治療法を確立するためには、CLD の詳細な作用メカニズムの理解が必要である。本研究では複数の GBM 細胞株を使って、増殖に関わるシグナルの特定を試みた。特に PI3K/mTOR 経路に着眼し、このシグナルと GBM 病態形成・維持間にある疑問点を薬理学的手法によって解決することを目指した。標準治療薬である TMZ との併用も実施し、治療実験の結果から効果が認められた因子については、動物実験で検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と分化、治療実験

本研究にはヒト由来 GBM 細胞株である U251、T98G、LN229 および NGT41 の計 4 種の細胞株を用いた。各細胞は、増殖および維持において 10% 牛胎児血清と抗生物質を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて 5% CO₂ 環境下 37°C で培養した。治療実験では 96 ウェルプレートに各 GBM 細胞を播種し、各種試験薬剤 (CLD または TMZ 単独およびその 2 剤併用) による処理を行った後、72 時間培養した。治療効果の判定は、細胞生存率を指標とし WST アッセイにより評価した。また、薬剤処理した細胞については、細胞周期への影響を検討するため、細胞を回収し Muse cell cycle reagents によって染色、細胞周期の解析を実行した。

(2) 腫瘍制御に影響する因子の検討

抗腫瘍効果に関わる細胞内シグナルを特定するため、イムノブロットィングによりシグナルに影響する因子を特定することを試みた。上記 GBM 細胞株の培養液中に対し、試験薬剤を一定濃度に振り分けて添加し、72 時間培養した。その後細胞は回収し、破碎処理によってタンパクを抽出した。PI3K/mTOR 経路の異常に着眼し、mTOR 下流シグナルである p70S6K および S6K などに対する特異的抗体を用いて腫瘍内タンパクの発現量変化を評価した。

(3) MGMT 発現と TMZ 治療効果の関連性

これまでに GBM の標準治療薬 TMZ による抗腫瘍効果は、腫瘍内の DNA 修復酵素の一つである MGMT の発現に左右されることが知られる。MGMT 発現株である T98G および NGT41 細胞において、CLD 処理を実施し、MGMT の発現量をウエスタンブロットによって解析した。合わせて、MSP (methylation specific PCR) による DNA プロモーター領域のメチル化解析も実施した。

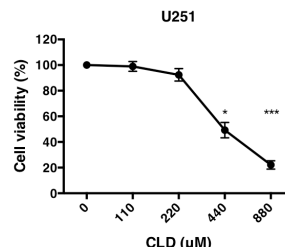
(4)in vivo 解析：疾患モデルと mTOR

上記細胞の実験の結果を *in vivo* で再現、検証することが目的である。我々はいくつかの研究から疾患脳由来 NGT41 培養細胞を樹立している。この細胞をマウスへ皮下投与することで異種移植モデルを作成する。このモデルに対し、CLD または TMZ を単独あるいは併用投与し、腫瘍の大きさを指標として、抗腫瘍効果を判定する。薬剤投与終了後、皮下腫瘍は摘出し、ウエスタンブロットまたは免疫染色にて細胞増殖能や MGMT の発現比較などの各種実験を行った。

4. 研究成果

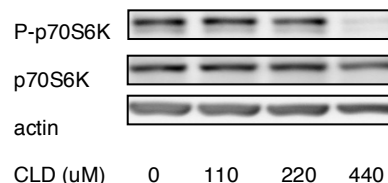
(1) 細胞培養と分化、治療実験

ヒト由来膠芽腫細胞 U251、T98G、LN229 および NGT41 に対して CLD、TMZ による薬剤処理を 72 時間行い、WST アッセイによって細胞生存率を測定した。その結果、CLD は全ての細胞株に対して濃度依存的に各 GBM 細胞の分化・増殖を抑制した。



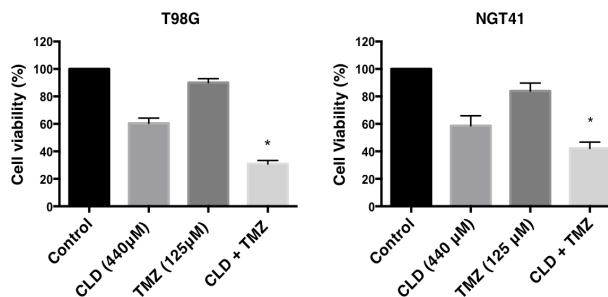
(2) 腫瘍制御に影響する因子の検索

CLD による抗腫瘍効果と mTOR 活性との関連を調べるために mTOR 下流の p70S6K、S6K のリン酸化への影響について調べた。CLD は薬剤暴露による細胞生存率の低下に沿うように p70S6K S6K の脱リン酸化を誘導した。特に p70S6K のリン酸化については、薬剤添加後 60 分までに半減した。



(3) MGMT 発現と治療効果の関連性

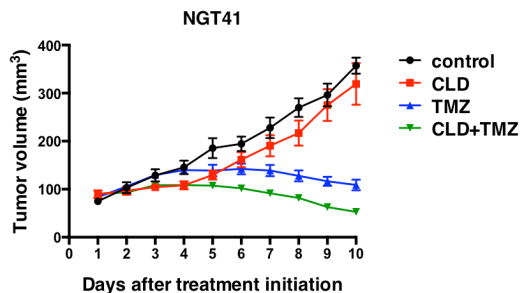
CLD の抗腫瘍効果は TMZ の併用により影響を受けるのか調べた。その結果、CLD は TMZ との併用により細胞生存率が優位に低下することがわかった。特にこの作用は MGMT 陽性株である T98G および NGT41 において顕著であった。ウエスタンブロットにより MGMT の発現を調べると CLD は単独で MGMT 発現を低下することがわかった。これらの細胞株については MGMT 遺伝子のプロモーター領域において DNA 非メチル化も確認した。



(4)in vivo 解析：疾患モデルと mTOR

NGT41 細胞をヌードマウス皮下へ移植し、生体内で実験的に腫瘍を作成した。腫瘍が一定の大きさにまで増殖した時点で、このモデル動物を 4 群に割り付け、それぞれの試験薬を 10 日間連続投与した。効果判定は腫瘍の大きさ Tumor volume を指標とした。その結果、CLD は単独投与よりもむしろ TMZ との併用により腫瘍の増殖を著しく抑制した。

投与終了後、皮下腫瘍は摘出し、免疫染色によって細胞増殖能について検討した。すると CLD は TMZ の併用によって細胞増殖能が著しく低下していた。



以上の結果、CLD は単独投与よりも TMZ との併用によって、高い抗腫瘍効果が得られることが示唆された。その機序を説明するにはさらなる議論の余地があるが、CLD の作用は PI3K/Akt/mTOR シグナルの制御に基づくこと、CLD は DNA 修復酵素である MGMT の発現を低下することによって TMZ の効果を保持することなどが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanemaru, Y, Natsumeda M, Okada M, Saito S, Kobayashi D, Eda T, Watanabe J, Saito S, Tsukamoto Y, Oishi M, Saito H, Nagahashi M, Sasaki T, Hashizume R, Aoyama H, Wakai T, Kakita A, and Fujii Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Dramatic response of BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor: establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-019-0774-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江田岳誉、金丸優、岡田正康、栗田学、大石誠、藤井幸彦
2. 発表標題 mTORシグナルを標的とした悪性グリオーマに対する新規化学療法の基盤研究
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	栗田 学 (NATSUMEDA MANABU) (00515728)	新潟大学・脳研究所・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------