

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08944

研究課題名(和文) ドラッグリポジショニングを用いた非VEGF経路に対する新規抗血管新生薬開発

研究課題名(英文) Development of new anti-angiogenic drugs for non-VEGF pathway using drug repositioning

研究代表者

道上 宏之(Michiue, Hiroyuki)

岡山大学・中性子医療研究センター・准教授

研究者番号：20572499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在の悪性脳腫瘍治療では外科手術、放射線療法、化学療法の3つが主であり、これに加え免疫療法などの組み合わせ治療による集学的治療が行なわれているが、以前予後不良である。その中で、悪性腫瘍への抗血管新生療法の概念は古く1970年代より提唱されており、抗ヒトVEGFモノクローナル抗体のベバシズマブの開発にて大腸癌・卵巣癌、肺癌などでの効果が示されたが、悪性腫瘍での予後延長効果は認めなかった。今回我々は、この治療抵抗性の原因を突き止め、新たな薬剤との併用により新たな効果を突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍に栄養や酸素などを供給する腫瘍血管の形成をブロックして、腫瘍を兵糧攻めにする抗血管新生療法は、概念として素晴らしいものである。膠芽腫(悪性神経膠腫)に対する抗血管新生療法は、臨床試験において有効性を示さなかった。これはこの治療法の概念を否定するものでなく、使用したVEGFR/VEGF-R経路阻害薬の抗VEGF抗体だけでは不十分であるとの仮説を立て、本研究の着想に至った。我々は、治療抵抗性の原因となると考えた脳腫瘍幹細胞由来の新たな血管を攻撃する薬剤の開発研究を行った。またこの薬剤がどのような働きをするかを解明し、今後の研究発展へ繋げた。

研究成果の概要(英文)：The current treatments for malignant brain tumors are mainly surgery, radiation therapy, and chemotherapy, and in addition to this, multidisciplinary treatment by combination therapy such as immunotherapy is performed, but the prognosis is previously poor. Among them, the concept of anti-angiogenic therapy for malignant tumors has been advocated since the 1970s, and the development of bevacizumab, an anti-human VEGF monoclonal antibody, has been shown to be effective in colorectal cancer, ovarian cancer, lung cancer, etc. However, no prognosis-prolonging effect was observed in malignant tumors. This time, we have identified the cause of this treatment resistance and identified a new effect by using it in combination with a new drug.

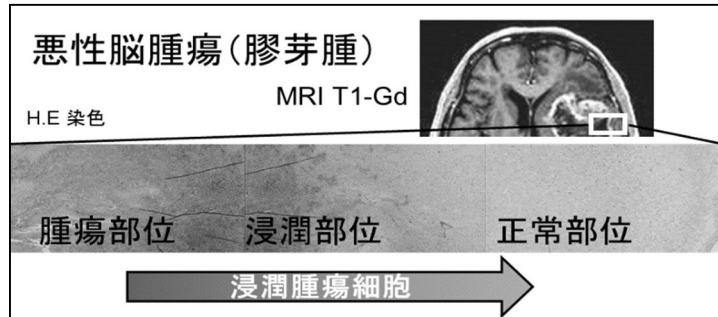
研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：抗血管新生療法 抗血管背陰性薬 脳腫瘍幹細胞 膠芽腫 VEGF 既存薬再開発 血液脳関門 血管内皮細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在の悪性脳腫瘍治療では外科手術、放射線療法、化学療法の3つが主であり、これに加え免疫療法などの組み合わせ治療による集学的治療が行なわれている。しかし、最も悪性度の高い膠芽腫では治療技術の発達にもかかわらず、平均生存期間約1年数か月、5年生存率数%と極めて予後不良である。その理由として、**腫瘍が脳内へ浸潤性発育する特性が挙げられる**。このような高浸潤能を持つ腫瘍は、MRI等の画像診断上描出される腫瘍領域の外側の正常



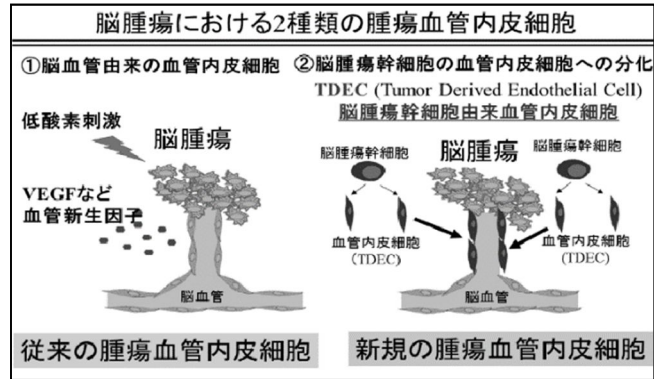
脳に、細胞レベルで多くの腫瘍細胞が散在している(上図)。そのため、正常組織に浸潤している腫瘍細胞を正確にイメージすることが困難であり、細胞レベルでの治療に至っておらず、予後不良の原因となっている。

その中で、悪性腫瘍への抗血管新生療法の概念は古く1970年代より提唱されており、抗ヒトVEGFモノクローナル抗体のベバシズマブ(アバスチン® 中外製薬)が、国内外において切除不能進行・再発大腸癌に対する標準治療として確固たる地位を築いている。抗血管新生薬を用いた代表的な悪性脳腫瘍(膠芽腫)に対する北米の臨床試験 AVAglio studyにて、標準治療(外科治療+アルキル化剤+放射線治療)に抗血管新生薬アバスチン(ベバシズマブ)を上乗せの結果において、**アバスチンによる生存期間延長はなく、有意な差は認めなかった**(Gilbert MR, et al, N Engl J Med, 2014)。抗血管新生薬アバスチンを用いた抗血管新生療法の効果不十分の原因は悪性脳腫瘍(膠芽腫)に対してだけでなく、転移性乳癌や一部の卵巣癌でも同様の結果であった。抗血管新生療法が、有効な結果を示さないことに関して、現在のがん血管新生阻害薬の多くがVEGFR/VEGF-R(血管内皮増殖因子: Vascular Endothelial Growth Factor)経路に作用することに着目した。言うまでも無く、VEGF経路は腫瘍血管新生において最も中心的役割果たす代表的な経路である。そこで我々は、「悪性脳腫瘍において、VEGFは腫瘍血管形成において重要な経路であるが、VEGF経路が阻害されても非VEGF経路により腫瘍血管形成が代償される機構が存在し、腫瘍血管は維持され、アバスチン単独では抗血管新生治療による予後延長が得られない」との、仮説を立て研究計画を推進した。

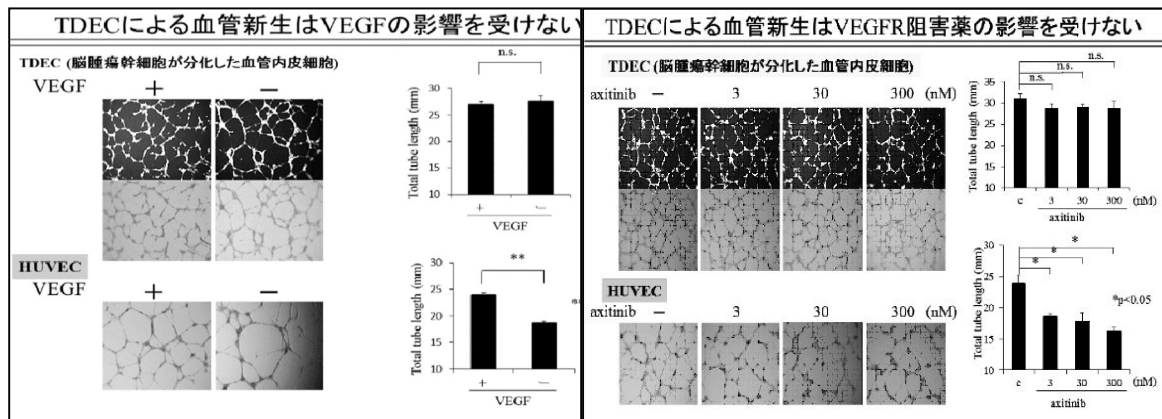
2. 研究の目的

我々は、脳腫瘍血管に2種類の起源の異なる腫瘍血管内皮細胞があることを共同研究者と共に報告した(Soda Y, Michiue H, et al PNAS, 2011)。1つは腫瘍より放出される血管増殖因子等により形成される従来型の脳血管由来の腫瘍血管内皮細胞である。腫瘍血管全体の80-90%を占める。2つ目は、脳腫瘍幹細胞より直接分化した脳腫瘍血管内皮細胞(Tumor Derived Endothelial Cell: TDEC)である。これは外胚葉由来の脳腫瘍幹細胞が中胚葉の血管内皮細胞へと直接分化した細胞である。このTDECは、腫瘍血管内皮細胞の10-15%程度と報告されている。さらにこの腫瘍由来の血管内皮細胞TDECの細胞培養に成功した。

この TDEC は、腫瘍血管内皮細胞の 10-15% 程度と報告されている。さらにこの腫瘍由来の血管内皮細胞 TDEC の細胞培養に成功した。次に、この 2 種類の血管内皮細胞への VEGF の反応性を検証したところ、脳腫瘍幹細胞由来の血管内皮細胞 (TDEC) は VEGF 無添加の培養培地で発育し、さらに VEGF 阻害薬による影響を受けないことを示した。この理由として、腫瘍血管における VEGF 経路において最も大きな役割をはたす受容体 VEGF-R2 の発現は TDEC ではなかったことに起因する。以上より TDEC による腫瘍血管は、これまで



での腫瘍血管と異なり、VEGF 経路に非依存である、という仮説を支持する結果となった。これまで VEGF 経路を対象とした腫瘍血管を標的としていたが、今後は他の経路による腫瘍血管へのアプローチが必要と考えられた。



3. 研究の方法

脳腫瘍幹細胞由来の腫瘍血管内皮細胞を標的とした抗血管新生療法薬剤開発

DR (Drug Repositioning, 既存薬再開発) を用いた、ドラッグスクリーニング

脳腫瘍モデルに対し、VEGF 経路阻害薬との同時投与による薬効の評価

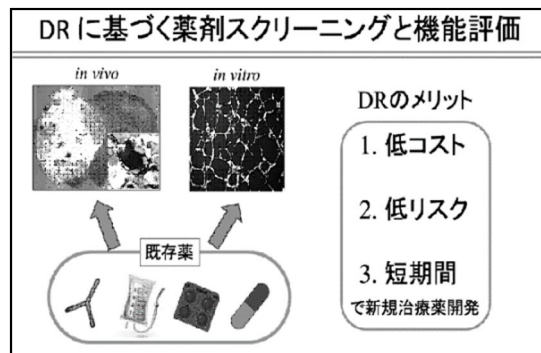
2種類の脳腫瘍血管の特徴		
	脳血管由来の腫瘍血管 (通常腫瘍血管)	脳腫瘍幹細胞由来の腫瘍血管 (新しい腫瘍血管)
VEGFR-2 の発現	高発現	発現無し
血管新生方法	VEGF 依存的	VEGF 非依存的
VEGF 経路の阻害薬の効果	有り	無し

VEGF 受容体の発現 (Western Blotting)

	脳血管由来	幹細胞由来
VEGF-R2	+	-
β-actin	+	+

In vitro tube formation assay

1. 脳腫瘍幹細胞を低酸素環境下にて培養
2. マトリゲル上培養し血管内皮細胞分化。血管構造模した tube formation 形成を観察評価。
3. 条件に合致する抗精神病薬系/抗癌薬系/Parkinson 治療薬系薬剤等の候補薬剤決定



4.3 の薬剤より血管構築阻害効果を評価判定。抗血管新生効果のメカニズム解析

候補薬剤の細胞毒性の検証

1. 初代培養グリア細胞・その他細胞を用いて候補薬剤の毒性評価

脳腫瘍移植マウスおよび脳腫瘍幹細胞移植モデルマウスを用いた薬効評価

1. 従来抗血管新生薬投与による効果の評価

2. 従来薬剤(VEGF 経路阻害)+新規薬剤 (TDEC 血管阻害) 併用による効果評価

	平成30年度(2018年)	平成31年度(2019年)	平成32年度(2020年)
実験	薬剤スクリーニング	毒性評価・動物評価	動物評価・メカニズム解析
到達目標	DRに基づく薬剤選択	薬剤決定・モデル構築	効果判定・メカニズム
到達困難な場合	薬剤のスクリーニング範囲の拡大	薬剤濃度の調整・投与 薬剤方法の検討	動物での効果評価の検討 マイクロアレイ等の評価

4. 研究成果

2種類のマウス脳腫瘍モデルでの検討

分化した悪性神経膠腫細胞と未分化の脳腫瘍幹細胞を BALB/c nu/nu マウスの脳内へ定局的に移植し、腫瘍形成が確認された後に、VEGF/VEGF-R の阻害薬を投与して、生存期間、頭部画像精査、病理組織学的検討を行った。

分化した悪性神経膠腫細胞 U87delta EGFR を移植したグループにおいては、VEGF/VEGF-R 経路阻害薬投与群において、優位な予後延長効果を得た。組織学検討においても、VEGF/VEGF-R 経路阻害投与群において、著名な腫瘍縮小効果が得られており、腫瘍中心部では虚血による壊死が見られていた。これは、VEGF/VEGF-R 経路阻害薬による腫瘍血管増生が抑制されており、それによる効果であり、これまでの報告と矛盾しないものであった。

一方、未分化の脳腫瘍幹細胞 005 を同様に移植した群においては、生存期間において、コントロールグループと比較して、優位な生存期間延長効果を認めなかった。これは、これまでの動物モデルではほとんど報告の無く、臨床像と非常に類似していた。途中、頭部 MRI 画像精査においても、腫瘍縮小効果はなく、2群間で腫瘍体積の差を認めなかった。組織学的に検討したところ、VEGF/VEGF-R 経路阻害薬投与グループにおいて、コントロールグループと比較して優位な血管増生が起こっていることが確認された。これは、抗血管新生療法抵抗性の原因と我々が仮説を立てた、VEGF/VEGF-R 経路阻害薬投与により新たな血管新生が起きているとの仮説に合致すると考えられた。申請血管の70%程度は、VEGF 受容体の発現が無いことが確認されており、非 VEGF/VEGF-R 経路による血管新生が誘導されていると考えられた。

In vitro tube formation assay

悪性脳腫瘍での薬剤開発において、もっとも重要な点は、血液脳関門 (BBB) を通過可能な薬剤であるか否かである。これまでの報告によると、薬剤開発において作成された低分子化合物の98%は、血液脳関門を通過しないと言われていています。今回、腫瘍血管新生阻害効果の薬剤スクリーニングするにあたって、チューブフォーメーションを利用し

た。チューブフォーメーションは、血管内皮細胞をマトリゲル上で培養することにより、血管内皮毛細血管の網目状組織形成を明瞭に模倣し、総構造物距離を測定することにより、定量性を持った検討を行う事が可能となる。さらに、抗腫瘍効果を持つ薬剤は、濃度依存的な効果を有するために、使用可能投与量と危険投与量が近い薬剤は、今後の臨床応用に不適と考え、抗うつ薬、抗精神病薬、抗不安薬などよりの薬剤候補選択とした。また、使用する腫瘍血管内皮細胞として、脳腫瘍幹細胞より直接内皮細胞へ分化させた細胞を利用した。この内皮細胞についての、腫瘍内における働きについてはまだ明らかにはされていないが、この脳腫瘍幹細胞由来の血管内皮細胞が、VEGF/VEGF-R 経路阻害薬による抗血管新生抵抗性の原因と考え、現在、この内皮細胞によるチューブフォーメーションを行った。30種類程度の候補薬剤を、チューブフォーメーションによる抗腫瘍血管阻害スクリーニングを行ったところ、数種類の抗うつ薬に高いチューブフォーメーションの阻害効果を得ました。

細胞増殖アッセイ

上記で得られた薬剤に関して、血管内皮細胞様細胞によるチューブフォーメーションの阻害効果が、細胞毒性によるものかを検討した。ここで細胞毒性による効果であるとする、今後の動物モデル、臨床応用に於いての毒性が懸念されます。そこで、今回使用したスクリーニング候補薬剤を利用して、毒性評価を行った。その中では、チューブフォーメーション抑制効果を認める濃度での、毒性を示す薬剤はほとんど認めず、既存薬再開発 (Drug Repositioning) であることの有利性が得られた。毒性評価は、腫瘍細胞、正常細胞、血管内細胞を用いて WST-8 を利用して、投与後 24 時間、48 時間にて評価を行った。

遺伝子解析

VEGF/VEGF-R 経路阻害薬の効果は、VEGF/VEGF-R 経路にあるのは自明である。今回、我々が標的としている非 VEGF/VEGF-R 経路を探索するために、RNA Sequencing (RNA-Seq) を行った。脳腫瘍幹細胞由来の血管内皮細胞と候補薬剤を加えて 24 時間の検体を用いての RNA は発現解析を施行した。現在、候補経路と言える幾つかの血管新生に関する pathway が確認され、最終確認である。詳細については、論文報告をもって行う予定である。

脳腫瘍幹細胞移植動物モデル

未分化の脳腫瘍幹細胞を BALB/c nu/nu マウスの脳内へ定位的に移植し、腫瘍形成が確認された後に、コントロールグループ (薬剤なし)、VEGF/VEGF-R の阻害薬の投与グループ、VEGF/VEGF-R 経路阻害薬+新規腫瘍血管阻害薬の併用グループの 3 群間にて、生存期間、頭部画像精査、病理組織学的検討を行っており、今後成果については報告する予定である。

現在、このプロジェクトによって得られた結果を最終確認段階であり、結果を論文報告、学会発表、メディア発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hakata Yoshiyuki, Michiue Hiroyuki, Ohtsuki Takashi, Miyazawa Masaaki, Kitamatsu Mizuki	4. 巻 29
2. 論文標題 A leucine zipper-based peptide hybrid delivers functional Nanog protein inside the cell nucleus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 878 ~ 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 SHIBA Hiroyuki, TAKEUCHI Koji, HIRAMATSU Ryo, FURUSE Motomasa, NONOGUCHI Naosuke, KAWABATA Shinji, KUROIWA Toshihiko, KONDO Natsuko, SAKURAI Yoshinori, SUZUKI Minoru, ONO Koji, OUE Shiro, ISHIKAWA Eiichi, MICHIE Hiroyuki, MIYATAKE Shin-Ichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Boron Neutron Capture Therapy Combined with Early Successive Bevacizumab Treatments for Recurrent Malignant Gliomas - A Pilot Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 487 ~ 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2018-0111	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 -

1. 著者名 Latt Hein Min, Matsushita Hiroaki, Morino Miku, Koga Yuuri, Michiue Hiroyuki, Nishiki Teiichi, Tomizawa Kazuhito, Matsui Hideki	4. 巻 379
2. 論文標題 Oxytocin Inhibits Corticosterone-induced Apoptosis in Primary Hippocampal Neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 383 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2018.03.025	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 6件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Hiroyuki Michiue, Nobushige Tsuboi, Keiichiro Hayashi, Hideki Matsui, Kazuhiko Kurozumi
2. 発表標題 New drug discovery with drug re-positioning system toward GBM treatment
3. 学会等名 2019 Society of Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Michiue, Asami Fukunaga, Mizuki Kitamatsu, Natsuko Kondo, Yoshinori Sakurai, Atsushi Fujimura, Kazuyo Igawa, Hideki Matsui, Shuichi Furuya
2. 発表標題 New peptide Drug Delivery System with BSH toward future BNCT clinical application
3. 学会等名 10th Young Reserchers BNCT Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 ペプチドDDSを用いた新規ホウ素 薬剤製剤化への取り組み
3. 学会等名 第3回NTRCシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上宏之, 井川和代, 古矢修一, 市川康明, 吉橋幸子, 瓜谷章, 渡辺賢一, 鬼柳善明, 土田一輝
2. 発表標題 The cell biological evaluation with Nagoya University BNCT system
3. 学会等名 第16回日本中性子捕捉療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Michiue
2. 発表標題 The role of calcineurin in controlling cell function in hair generation
3. 学会等名 National Symposium and Workshop in Anti-Aging Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Michiue
2. 発表標題 Translational research in hair generation from lab to life
3. 学会等名 National Symposium and Workshop in Anti-Aging Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) のメラノーマ治療における位置づけ～BNCTの基礎より最新の研究まで～
3. 学会等名 第6回岡山メラノーマ治療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 再発メラノーマに対するBNCTを含めた新規集学的治療の取り組み
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之 福永麻美 北松瑞生 近藤夏子 櫻井良憲 藤村篤史 井川和代 松井秀樹 古矢修一
2. 発表標題 ペプチドDDSを用いた新規ホウ素薬剤の構築
3. 学会等名 第15回日本中性子捕捉療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 New multidisciplinary treatment with Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) against melanoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 New self-assembling peptide Drug Delivery System with BSH toward clinical application
3. 学会等名 18th International Congress on Neutron Capture Therapy (ICNCT-18) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 New A6k boron drug delivery system for clinical application of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)
3. 学会等名 2018 Annual Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 BNCTを用いた新規岡山大学メラノーマ集学的治療へ向けた取り組み
3. 学会等名 第2回中性子医療研究センターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 BNCT治療の現実とこれから
3. 学会等名 第2回中性子医療研究センターシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 脳腫瘍幹細胞由来の腫瘍血管を標的とした新規抗血管新生療法の開発
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 グルコース結合ホウ素薬剤	発明者 道上宏之 高口豊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-051323	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------