

令和 5 年 9 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16584

研究課題名(和文) グリオーマにおけるRac1-GSPT1軸をターゲットとした新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic agents targeting Rac1-GSPT1 axis in glioma

研究代表者

石井 大嗣 (Ishii, Taiji)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80622167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GSPT1はRac1の下流の分子で、細胞周期を調節する重要な分子である。最近GSPT1阻害剤として報告されたセレブロン結合分子CC-885による抗腫瘍効果について、グリオーマ細胞を用いて解析した。悪性グリオーマではGSPT1の発現量と予後とに関連性は無かった。CC-885をグリオーマ細胞に添加すると、GSPT1の蛋白発現は著明に低下し、細胞増殖も抑制された。マウスの脳移植モデルにCC-885を投与すると、脳内で腫瘍の増大が抑制され、アポトーシスも増加し、マウスの生存期間も有意に延長した。以上より、CC-995はグリオーマ細胞に対して高い抗腫瘍作用をしめし、新たな治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫を始めとする悪性グリオーマは未だ有効な治療方法がない非常に予後不良な脳腫瘍で、新たな治療ターゲットが切望されている。本研究では、細胞周期調節因子のGSPT1に着目した。まず、GSPT1がグリオーマ組織で高度に発現していることが確認された。また、セレブロン結合分子で最近GSPT1阻害剤として報告されたCC-885をマウスのグリオーマ細胞脳移植モデルに投与すると、著明な抗腫瘍効果を示したことから、GSPT1阻害はグリオーマに対する新たな治療ターゲットとして有望であることが示された。今後、GSPT1をターゲットとした新たな薬剤も開発されていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：GSPT1 is a downstream molecule of Rac1 and is an important molecule that regulates the cell cycle. The antitumor effect of CC-885, a cereblon-binding molecule recently reported as a GSPT1 inhibitor, was analyzed using glioma cells. There was no relationship between the expression level of GSPT1 and prognosis in malignant glioma. When CC-885 was added to glioma cells, GSPT1 protein expression was markedly reduced and cell proliferation was also suppressed. When CC-885 was administered to a mouse brain transplant model, tumor growth was suppressed in the brain, apoptosis was increased, and the survival time of the mice was significantly prolonged. Based on the above, CC-995 showed high antitumor activity against glioma cells, suggesting the possibility of becoming a new therapeutic agent.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：Glioblastoma GSPT1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは脳原発腫瘍の中で発生頻度が最も高い腫瘍の1つで、集学的治療を行っても平均生存期間が1年半と極めて予後不良な疾患である。近年、多くの新規抗腫瘍薬が開発され臨床試験されているが、十分に生命予後を改善させる薬剤は未だ無く、有効な治療薬の開発が切望されている。申請者は以前の研究で、脳損傷時のアストロサイトの役割について Rac1 ノックアウトマウスを用いて研究したが、Rac1 の下流分子同定のため、Rac1 ノックダウン細胞を用いた DNA マイクロアレイを行った。コントロール細胞に比し2倍以上低下した分子に着目した結果、Rac1 の下流分子候補として GSPT1 (G1 to S phase transition 1) を同定した。⁽¹⁾ GSPT1 の低下は、Rac1-siRNA によっても確認され、更に、GSPT1 の発現が炎症惹起物質である LPS により亢進し、Rac1 ノックダウンによって抑制されたことから、まぎれもなく GSPT1 が Rac1 の下流分子として機能していることが証明された。

GSPT1 は細胞周期の G1 期から S 期への移行を調整するタンパクとして 1998 年に同定された蛋白だが、eRF1-eRF3 複合体を介した蛋白翻訳終結を調整する機能も有していることが報告されている。しかし、GSPT1 の機能についてはあまりよく分かっていない。申請者は、インキュベーター蛍光顕微鏡下 Fucci system を用いて Rac1 ノックダウン HeLa 細胞を観察すると、著明に細胞周期が延長したことから、Rac1 は細胞周期を制御する蛋白であることが確認できた。更に、Rac1 ノックダウンによって細胞周期が延長した細胞は GSPT1 発現により細胞周期がレスキューされたことから、Rac1-GSPT1 シグナル軸が細胞周期を制御することが申請者らの研究で明らかとなった。⁽¹⁾

近年、サリドマイド派生薬剤である CC-885 が、ユビキチンリガーゼ セレブロン(cereblon) に結合することで、GSPT1 の分解を促進し、その結果癌細胞を細胞死に誘導することが報告された。⁽²⁾ これまでのところ GSPT1 とグリオーマに関連する報告はない。グリオーマにおいて GSPT1 の発現が亢進していれば、新たな治療ターゲットとなりうる可能性を秘めていると考えられる。

2. 研究の目的

GSPT1 のグリオーマでの発現を解析し、その発現量と予後との関連について解析する。さらにグリオーマにおいて、セレブロン阻害剤(CC-885)を用いて腫瘍増殖抑制効果の有無について検証を行う。

3. 研究の方法

GSPT1 のグリオーマ腫瘍組織での発現解析

グリオーマの腫瘍組織サンプルを用いて GSPT1 の発現を免疫染色およびウエスタンブロットで解析する。

GSPT1 の発現とグリオーマの悪性度、予後との関連の検討

組織所見(悪性度)、生存期間、治療方法などの情報を集め、GSPT1 の発現量との相関を検証する。

ラパマイシンによる GSPT1 発現の検討

グリオーマ培養細胞の培養液に mTOR 阻害剤であるラパマイシンを添加して培養した後、細胞を回収し RNA を抽出し、realtime-RT-PCR にて GSPT1 の発現量を解析する。

培養細胞におけるセレブロン阻害剤 CC-885 による GSPT1 発現の検討

グリオーマ培養細胞の培養液に CC-885 を添加して培養する。細胞を回収し、免疫染色、RT-PCR、western blot で GSPT1 の発現抑制を検証する。

培養細胞におけるセレブロン阻害剤 CC-885 による抗腫瘍効果の検討

U87 培養細胞に CC-885 を加えて、細胞の生存数をカウントし、抗腫瘍効果、細胞生存率を解析する。

マウス脳移植モデルにおけるセレブロン阻害剤 CC-885 による抗腫瘍効果の検討

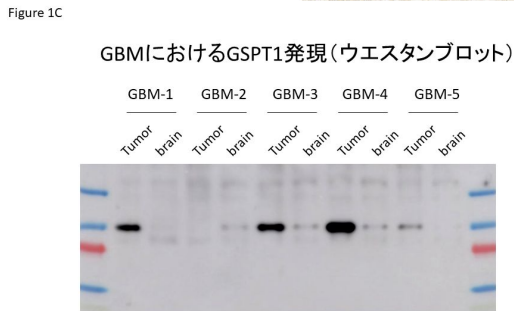
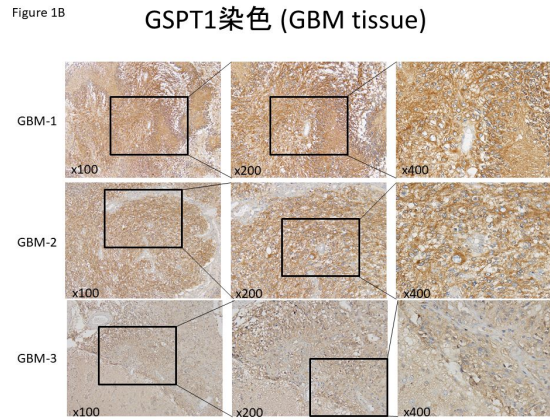
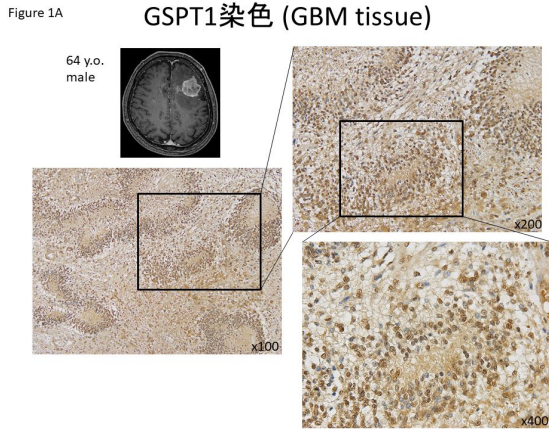
U87 グリオーマ細胞をヌードマウスの脳内に移植し、CC-885 を投与して、腫瘍細胞での病理所見、GSPT1 発現、アポトーシスの出現を観察する。さらに、マウスの体重変化、腫瘍の増大、生存期間を記録して、生存解析を行い、薬剤の抗腫瘍効果について検証を行う。

4. 研究成果

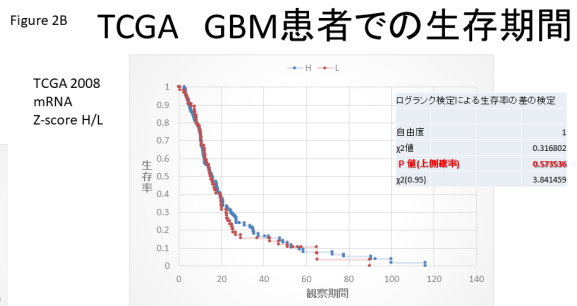
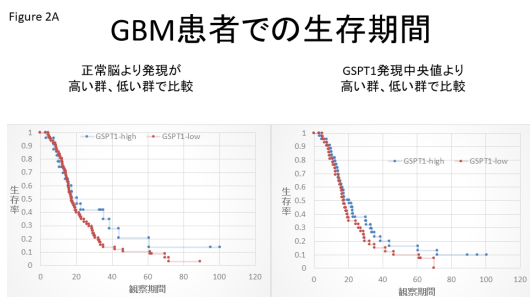
GSPT1 のグリオーマでの発現解析

In vitro での解析ではグリオーマ培養細胞 U87 において、GSPT1 が過剰に発現されていたため、実際のグリオーマ組織での GSPT1 の発現について、最初に解析した。様々なグレードのグリオーマ組織を GSPT1 の抗体で免疫染色すると、正常脳に比べ腫瘍では発現が増加していた。(Figure 1A,B) 腫瘍細胞は細胞質に優位に発現しており、細胞質で作用する蛋白であることが臨床検体でも確認できた。また、mRNA の発現について解析すると、腫瘍周囲正常脳と比較して、腫瘍では増加している傾向はあるものの、有意差は認めなかった。

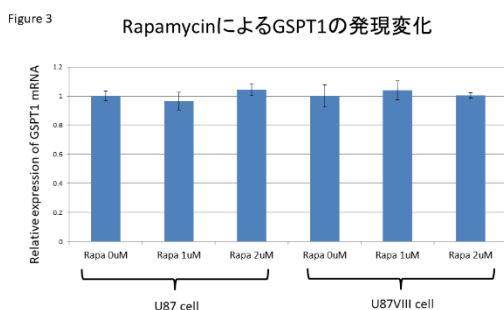
グリオーマのグレードと発現量を比較してもグレード間での有意な発現の差は認めなかった。



GSPT1 の発現とグリオーマの悪性度、予後との関連の検討
 神戸大学医学部脳神経外科で治療された膠芽腫での GSPT1 の発現量と予後を比較すると、発現の中央値で高い群と低い群に分類して生存期間を比較したが、有意な差は認めなかった。また、正常脳に比較して発現が高いものと低いものに分けて生存期間を比較したが、それでも有意な差は認めなかった。(Figure 2A) さらに、アメリカの TCGA の膠芽腫データを用いて、GSPT1 の発現が高いものと低いものに分けて生存期間を比較したが、有意な差は認めなかった。(Figure 2B)

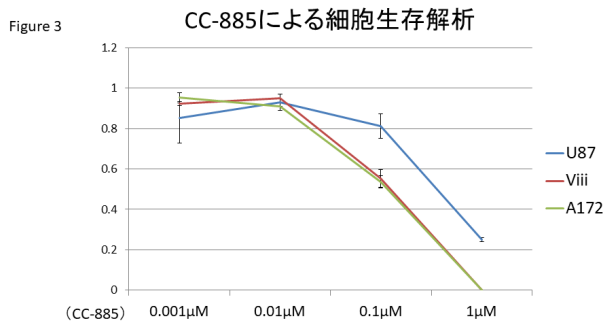


ラパマイシンによる GSPT1 発現の検討
 U87 および U87Viii 細胞にmTOR 阻害剤であるラパマイシンを投与して GSPT1 の発現を調べると、GSPT1 の発現に変化は見られなかった。(Figure 3)



培養細胞におけるセレブロン阻害剤 CC-885 による GSPT1 発現の検討
 U87 細胞にセレブロン阻害剤である CC-885 を投与して、GSPT1 の発現を免疫染色、ウェスタンブロットで調べると、著明に抑制されていた。

培養細胞におけるセレブロン阻害剤 CC-885 による抗腫瘍効果の検討
 U87、U87Viii、A172 グリオーマ細胞に対して、CC-885 を 0.001 μ M、0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M の濃度で投与すると、U87Viii、A172 細胞では IC50 は 0.1 μ M、U87 細胞では 0.15 μ M であり、低濃度で抗腫瘍効果を示すことが確認された。(Figure 3)



マウス脳移植モデルにおけるセレブロン阻害剤 CC-885 による抗腫瘍効果の検討
 U87 細胞をヌードマウスの脳内に移植し、CC885 40mg/kg を投与すると、コントロールと比較して有意に生存期間が延長した。また、体重の変化もコントロールと比較して著変なく、肉眼的な有害事象の発生も認めなかった。(Figure 4A)

次に同様に U87 細胞をヌードマウスの脳内に移植後、CC885 を 50mg/kg、100mg/kg の 2 種類の濃度で 4 回投与し、生存期間を解析すると、コントロールと比較して両群とも有意に生存期間を延長し、さらに 100mg/kg 群は 50mg/kg 群よりも有意に生存期間を延長した。(Figure 4B) また、IVIS を用いた腫瘍量蛍光計測でも、CC-885 投与群はコントロールと比較して、有意に腫瘍が縮小されていた。(Figure 4C) 腫瘍組織を採取して解析すると、HE 染色では腫瘍細胞は浮腫状の腫大し、細胞間の間隙が増大し、Ki-67 染色で CC-885 投与群では有意に Ki-67 index が低下していた。(Figure 4D) さらに GSPT1 の発現量を免疫染色で s ラベルと、著明に発現が抑制されていた。(Figure 4E) アポトーシスに関して Caspase3 発現を調べると、Caspase 3 の発現は著明に増大していた。さらに細胞周囲に関する phospho-ERK1/2 の発現を調べると、コントロールと比較して pERK1/2 の発現は著明に抑制されており、細胞周期の抑制が生じているものと推察された。

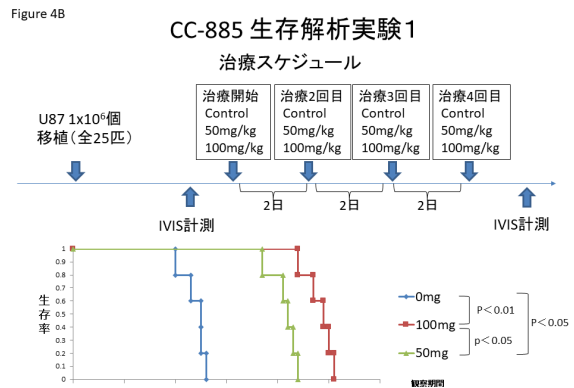
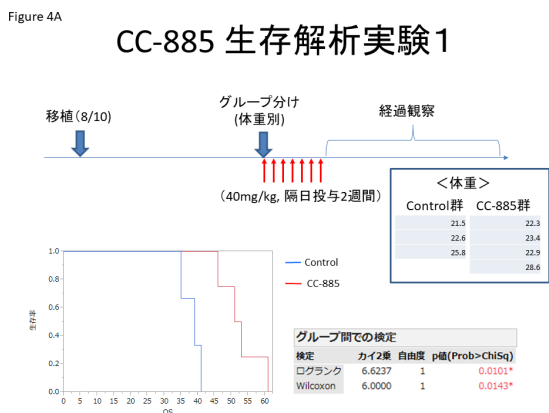


Figure 4C

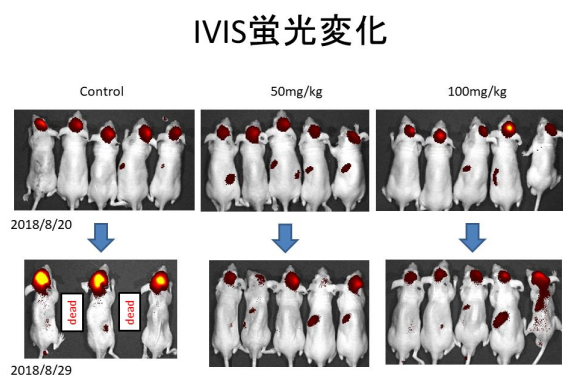


Figure 4D

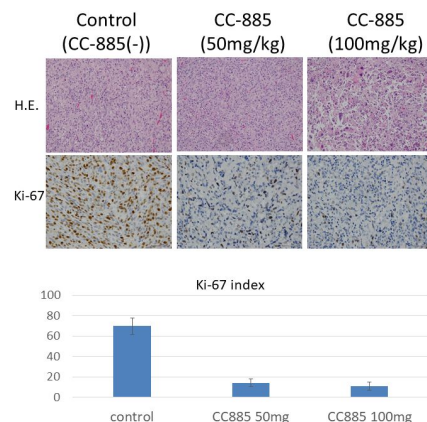
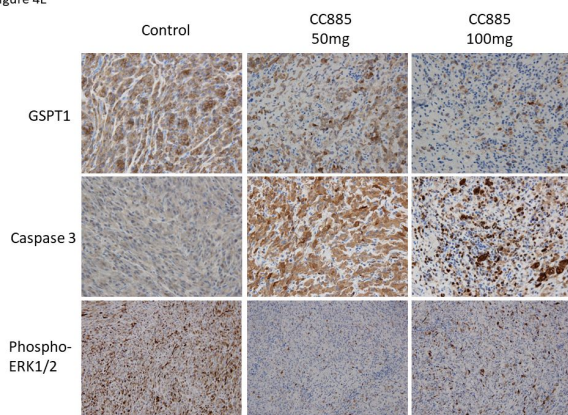


Figure 4E



参考文献

1) A Novel Rac1-GSPT1 Signaling Pathway Controls Astrogliosis Following Central Nervous System Injury. Ishii T, Ueyama T, Shigyo M, Kohta M, Kondoh T, Kuboyama T, Uebi T, Hamada T, Gutmann DH, Aiba A, Kohmura E, Tohda C, Saito N. J Biol Chem. 2017 Jan 27;292(4):1240-1250.

2) A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. Matyskiela ME, Lu G, Ito T, Pagarigan B, Lu CC, Miller K, Fang W, Wang NY, Nguyen D, Houston J, Carmel G, Tran T, Riley M, Nosaka L, Lander GC, Gaidarova S, Xu S, Ruchelman AL, Handa H, Carmichael J, Daniel TO, Cathers BE, Lopez-Girona A, Chamberlain PP. Nature. 2016 Jul 14;535(7611):252-7.

5 . 主な発表論文等

- [雑誌論文](0 件)
- [学会発表](0 件)
- [図 書](0 件)
- [産業財産権](0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：篠山 隆司

ローマ字氏名：Sasayama, Takashi

研究協力者氏名 上山 健彦

ローマ字氏名：Ueyama Takehiko

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 0件）

1. 著者名 Tanaka Jun、Fujita Atsushi、Ishii Taiji、Kohmura Eiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Importance of source images of time-of-flight magnetic resonance angiography in the diagnosis of low-flow dural arteriovenous fistulae after traumatic brain injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMJ Case Reports	6. 最初と最後の頁 bcr ~ 2017-223512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bcr-2017-223512	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井大嗣、三浦伸一、中村直人、坂田 純一、岡村有祐
2. 発表標題 当院における後方循環の血栓回収療法
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2018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
研究協力者	篠山 隆司 (SASAYAMA TAKASHI)		
研究協力者	上山 健彦 (UEYAMA TAKEHIKO)		

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