

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07624

研究課題名(和文) Talin1によるインテグリン活性化を介した神経膠(芽)腫悪性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of glioma malignant transformation mechanism of integrin activation by Talin-1

研究代表者

池田 幸樹 (IKEDA, Yoshiki)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：10633026

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)：神経膠芽腫(GBM)におけるインテグリン活性化による増悪化のメカニズムについて明らかにする上で、インテグリンを抑制する新規薬剤を開発した。この薬剤は顕著ながん増殖阻害効果が観察され、一方で、正常細胞においてはGBM細胞に比べて薬剤が効きにくいことを明らかにした。これらのことはインテグリンがGBM細胞の増悪化に寄与していることを強く示唆している。さらにこの薬剤を作用させたGBM細胞からRNA抽出を行い、トランスクリプトーム解析を実施した。その結果、GBM細胞におけるインテグリン活性化による新たなシグナル伝達メカニズムと複数の下流経路について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GBMは難治性希少疾患であり、有効な治療法が存在していないことから、治療法の開発に繋がる基礎研究の発展が求められている。本研究において開発した新規インテグリン阻害薬は正常細胞に効きにくく、かつ目的とするGBM細胞に効果的であった。今後、この作用機序が明らかになることで、GBM病態に対する新たな治療戦略に発展する可能性が大きいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project is to clarify the mechanism of proliferation by integrin signaling in glioblastoma (GBM). To achieve this goal, we have developed drugs that suppress integrin. We found that this drug possessed a GBM cell-specific growth inhibitory effect at IC50 of about 5 μ M. These findings strongly suggested that integrin contributed to the malignancy of GBM cells. Furthermore, RNA was extracted from GBM cells treated with this drug, and transcriptome analysis was performed. As a result, we clarified a new signal transduction mechanism and multiple downstream pathways by integrin activation in GBM cells.

研究分野：創薬科学, がん生物学, 細胞生物学, 生化学

キーワード：インテグリン 神経膠芽腫 阻害薬

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫 (GBM) は悪性度の高い希少がんであり、有効な治療法が存在していないことから、増悪化メカニズムの解明による新規治療法への発展が望まれている。これまでに神経膠芽腫の治療戦略としてインテグリンに着目した研究がなされており、安全性の高い治療標的としてアメリカ食品医薬品局に認知されている。特に、インテグリン α V β 3, α V β 5 が神経膠芽腫の増悪化を担う因子として報告があり、これらインテグリンを標的とした阻害薬である Cilengitide が報告されている。一方で、これらのインテグリン阻害薬群はマウスがんモデルでの検証では有効であるものの、患者への有効性が認められていない。私たちは神経膠芽腫において特定のインテグリン及びその活性化因子の発現が予後と有意に相関していることから、インテグリンによる神経膠芽腫の増悪化メカニズムについてより詳細に明らかにすることで新規治療法の発見に繋がるのではないかと仮説を立て、研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

池田はこれまでに新規インテグリン阻害剤の開発に成功しており、これらの薬剤が新規治療法に繋がる可能性がある。これらの薬剤を使って GBM 細胞の増殖にどのような影響が生じるかについて検討すること、そしてその作用機序について明らかにすることで、インテグリン阻害による GBM 治療の検証を目的とした。

3. 研究の方法

開発したインテグリンに対する新規薬剤の投与によって GBM 細胞の増殖に影響が観察されるかどうかについて増殖アッセイを行うことで評価する。またマウスを使ったがんモデルと相関が高いとされている 3D スフェア培養を用いて、薬効評価を行う。開発薬での増殖阻害が見られた場合には、薬剤の有無によって変化するシグナル経路を同定するためにトランスクリプトーム解析を行うことで、神経膠芽腫に与えるインテグリン経路の影響について明らかにする。これらによって明らかになった経路について、既に報告されてるインテグリン阻害剤あるいは経路阻害剤を使って比較検証を行う。

4. 研究成果

本研究からインテグリンについて新しいケモタイプの創薬を実施し、複数のリード化合物を得るに至った。それらについて検証を行ったところ、開発した代表的なインテグリン阻害薬は *in vitro* アッセイ系において $IC_{50} = 8 \mu M$, GBM 細胞である U87MG に対して $EC_{50} = 6 \mu M$ の薬効を示した。この薬剤は正常細胞には効きにくく、ヒト embryonic fibroblast である OUMS-36 細胞に対して $EC_{50} = 15 \mu M$ であることから、正常細胞には効きにくく、GBM 細胞の増殖阻害に効果的に働くことが明らかになった。

次に、薬効メカニズムについて明らかにする目的で、薬剤の添加によって起こるがん特異的細胞死がアポトーシスによるものかどうかを検証したい。そこで、アポトーシス阻害薬である Pifithrin-1 をインテグリン阻害剤と同時に細胞に作用させたところ、薬剤による増殖阻害能が減弱したことから、このインテグリン阻害薬によってアポトーシス経路が活性化することが明らかになった。また、インテグリン阻害によってインテグリンを介した GBM 増殖に関わる経路探索を行うために、阻害薬を作用させて 16 時間後の細胞群から RNA を抽出し、トランスクリプ

トーム解析を行った。その結果、インテグリン阻害によってこれまで提唱されていない複数の経路が変動することが明らかになりつつある。これらのデータについては引き続き検証を進めており、結果が確かであることを証明した後に論文化を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takeuchi Koh, Ikeda Yoshiki, Senda Miki, Harada Ayaka, Okuwaki Koji, Fukuzawa Kaori, Nakagawa So, Yu Hong Yang, Nagase Lisa, Imai Misaki, Sasaki Mika, Lo Yu-Hua, Ito Doshun, Osaka Natsuki, Fujii Yuki, Sasaki Atsuo T., Senda Toshiya	4. 巻 30
2. 論文標題 The GTP responsiveness of PI5P4K evolved from a compromised trade-off between activity and specificity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 886 ~ 899.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2022.04.004	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 Ikeda Y., Hirayama A., Kofuji S., Hirota Y., Kamata R., Osaka N., Fujii Y., Sasaki M., Ikeda S., Smith EP., Bachoo R., Soga T., Sasaki AT.	4. 巻 -
2. 論文標題 SI-MOIRAI: A new method to identify and quantify the metabolic fate of nucleotides.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 699-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab077.	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 該当する
1. 著者名 Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Ikeda Y, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Female dominance of both spatial cognitive dysfunction and neuropsychiatric symptoms in a mouse model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0009.	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 Kawai K., Tomonou M., Machida Y., YKaru Y., Tarui A, Sato K., Ikeda Y, Kinashi T., Omote M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of Learning Dataset for Identification of Active Molecules: A Case Study of Integrin α 11b3 Inhibitors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular informatics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/minf.202060040.	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 Osaka N., Hirota Y., Ito D., Ikeda Y., Kamata R., Fujii Y., Chirasani VR., Campbell SL., Takeuchi K., Senda T., Sasaki AT.	4. 巻 -
2. 論文標題 Divergent mechanisms activating RAS and small GTPases through posttranslational modification outside the Switch regions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2021.707439.	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 該当する

1. 著者名 池田幸樹, 木梨達雄	4. 巻 39
2. 論文標題 インテグリン創薬から考える一回膜貫通型タンパク質における創薬ストラテジー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SAR News	6. 最初と最後の頁 17-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ikeda Y., Takeda H., Kinashi T.
2. 発表標題 A Design of integrin-miniature for novel therapeutics against virus infections
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikeda Y.
2. 発表標題 有用ペプチド開発のための新規ソフトウェア "PeptiCraft" の開発と実践
3. 学会等名 第12回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikeda Y., Takeda H., Kinashi T.
2. 発表標題 A Design of integrin-miniature for novel therapeutics against virus infections
3. 学会等名 第12回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikeda Y.
2. 発表標題 有用ペプチド開発のための新規ソフトウェア "PeptiCraft" の開発と実践
3. 学会等名 第33回高遠シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikeda Y., Takeda H., Kinashi T
2. 発表標題 Novel method for quantification of interaction between Integrin and the binding partner.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー	発明者 林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一	権利者 学校法人関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-055869	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー	発明者 林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一	権利者 学校法人関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2022/210524 A1	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー	発明者 林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一	権利者 学校法人関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-160708	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗SARS-CoV-2抗体	発明者 小澤 達彦, 谷 英樹, 池田 幸樹, 橋口 隆 生	権利者 学校法人関西医 科大学, 富山大 学, 富山県
産業財産権の種類、番号 特許、2022-149604	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 着床促進薬とそのスクリーニング系	発明者 松浦 徹, 池田 幸樹, 吉田 真子	権利者 学校法人関西医 科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-183639	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Therapeutic drug for myasthenia gravis	発明者 服部文幸, 池田幸樹	権利者 学校法人関西医 科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2023-066839	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/yoshikiikeda

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