

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09333

研究課題名(和文) 腫瘍免疫の再活性化を可能にする悪性グリオーマ分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of molecular-targeted therapeutic drugs for malignant glioma that enable reactivation of tumor immunity

研究代表者

高橋 寿明 (Takahashi, Hisaaki)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：20363228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はOct-3/4の発現を抑制し、かつ抗腫瘍免疫も抑制する化合物を見出すことを目指している。これまでに640の化合物ライブラリーから候補化合物24種を得ていた。二次スクリーニングを実施したところ、細胞傷害性が低く、顕著な細胞増殖抑制作用を示す化合物Fを得た。一方で、化合物Fは、正常アストロサイトの細胞増殖は抑制しなかった。そこで、マウスグリオーマ細胞移植モデルに対し、化合物Fの投与実験を行ったところ、形成されたグリオーマの縮小が認められた。化合物FはAMPKに結合する活性化剤であることをドッキングシミュレーション解析から明らかにしており、今後、詳細な検討をしていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマ治療においても免疫細胞の再活性化による腫瘍免疫治療薬が手術、放射線治療、化学療法に次ぐ「第4の柱」になりうるとして、国内外で研究開発が進められている。しかしながら、臨床試験段階ではあるものの有効性が報告されたものは少ない。

本研究結果は、免疫の中心的な役割を果たすT細胞の機能をOct-3/4が抑制し、グリオーマ細胞が宿主免疫システムから回避して増殖している可能性を示唆するものである。したがって、化合物Fは、Oct-3/4を抑制することで、浸潤、腫瘍幹細胞、腫瘍血管新生、薬剤耐性に加え、抗腫瘍免疫をも標的とし、停滞するグリオーマ治療の突破口になる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：This research aims to find a compound that suppresses Oct-3/4 expression and also suppresses anti-tumor immunity. The 24 candidate compounds have been obtained from a library of 640 compounds. When a secondary screening was performed, Compound F was obtained which had low cytotoxicity and exhibited a significant cell proliferation inhibitory effect. On the other hand, compound F did not inhibit cell proliferation of normal astrocytes. Therefore, when compound F was administered to a mouse glioma model, shrinkage of the formed glioma was observed. Docking simulation analysis has revealed that Compound F is an activator that binds to AMPK, and we would like to investigate a detailed study in the future.

研究分野：病態生理学

キーワード：グリオーマ 腫瘍幹細胞 腫瘍免疫 Oct-3/4

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマ治療において、DNA メチル化剤テモゾロミド (TMZ) の導入は非常に大きなブレイクスルーであった。しかし TMZ 耐性症例も多く、化学療法剤による悪性グリオーマ治療の限界も示唆されている。一方で、グリオーマの腫瘍生物学特性を利用した分子標的治療 (血管新生阻害剤、EGF 受容体阻害剤、MMP 阻害剤など) の開発が進められ、その有効性が期待されてきたが、血管新生阻害薬においては病態の一時的な改善効果は認められるものの、浸潤性再発や低酸素反応性の血管新生といった問題点が指摘されており、有意な生存延長効果は認められていない。EGF 受容体阻害剤においても有効性はごく限られた症例のみであり、単剤あるいは TMZ との併用療法でも十分な抗腫瘍効果を示す分子標的薬は見いだせていないのが現状である。

2. 研究の目的

悪性グリオーマは生存期間の延長すら極めて困難な疾患であり、既存の化学療法薬や分子標的薬、開発中の免疫治療も十分な治療効果をあげていない。その理由として、既存治療がグリオーマ悪性化要因の一面のみを標的としている点が考えられ、治療成績向上には、浸潤、腫瘍幹細胞、血管新生、薬剤耐性、抗腫瘍免疫など多面的な治療が必要である。

本研究は、申請者らがグリオーマ悪性化のマスター因子と考える Oct-3/4 の発現抑制だけでなく、TDO や IDO を抑制することで腫瘍免疫の再活性化も可能とする「万能型」低分子化合物を見つけ、新たな治療法確立に向けた基盤の構築を目的としている。

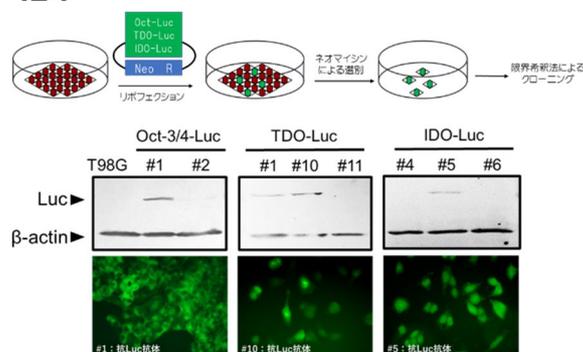
3. 研究の方法

- (1) Oct-3/4、TDO、IDO 遺伝子の各プロモーター制御下でルシフェラーゼを恒常的に発現するグリオーマ細胞株の樹立
- (2) 各細胞を用い、Oct-3/4、TDO、IDO 遺伝子の発現を抑制する化合物をルシフェラーゼアッセイによりスクリーニングする (一次スクリーニング)
- (3) 3つのアッセイで得られた候補化合物の効果を *in vitro* で評価する (遺伝子発現や細胞増殖など) (二次スクリーニング)
- (4) 候補化合物の抗腫瘍効果を *in vivo* で評価する (脳腫瘍モデル動物への薬剤投与) (三次スクリーニング)
- (5) 誘導体の合成: 最終候補化合物をリード化合物とした誘導体を合成する。

4. 研究成果

(1) Oct-3/4、TDO、IDO プロモーター下でルシフェラーゼを発現する plasmid をヒト膠芽腫細胞株である T98G にリポフェクション法により遺伝子導入し、薬剤選別等を経て単離し、強発現細胞株を実験に用いた (図1)。

(図1)



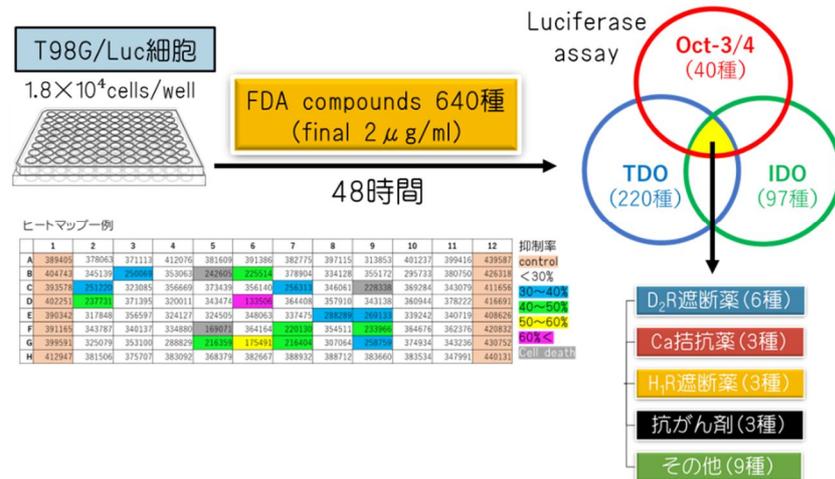
(2) 96well プレートに細胞をまき、翌日、FDA 化合物ライブラリー (640 種) の各化合物を終濃度 2 μg/ml で添加 (対照には DMSO を添加) した。培養 48 時間後、ルシフェラーゼアッセイを行い、発光強度を測定した (図2)。

Oct-3/4-Luc細胞で40種、TDO-Luc細胞で220種、IDO-Luc細胞で97種の化合物がヒットし、3つの細胞で共通してる化合物は24種であった (D₂受容体遮断薬: 6種、Ca拮抗薬: 3種、H₁受容体遮断薬: 3種、抗がん剤: 3種、その他: 9種) (図2)。

(3) 細胞毒性、グリオーマ悪性化に関わる遺伝子発現ならびに細胞増殖を指標に二次スクリーニングを行い、Compound.Fを最終候補化合物とした。興味深いことにCompound.Fはグリオーマ細胞株

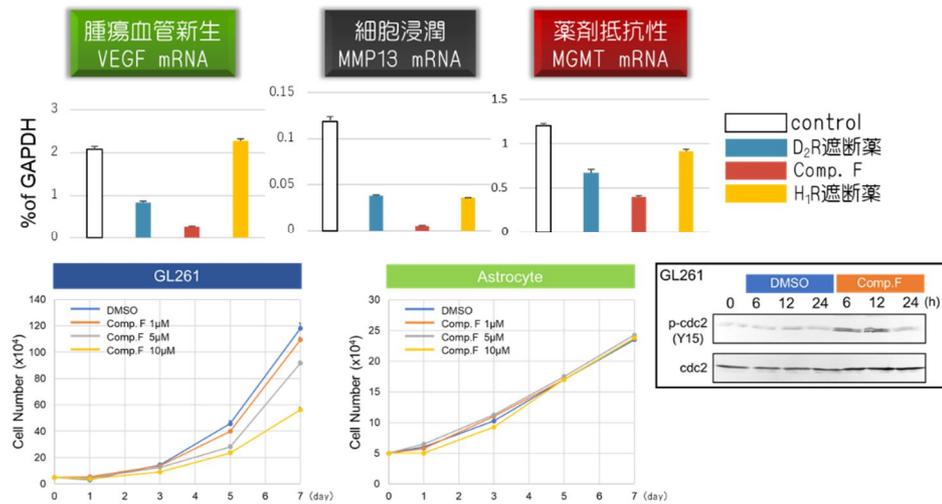
GL261の増殖は抑制するが、アストロサイトの増殖は抑制しないこと、またその機序としてG2/Mのチェックポイント蛋白であるcdc2を不活性化(Y15のリン酸化)していることが示唆された(図3)。

【図2】



(4) GL261細胞を脳内に移植したC57BL/6マウスに対して、Compound.Fを28日間経口投与したところ、腫瘍サイズの縮小傾向が認められた。さら

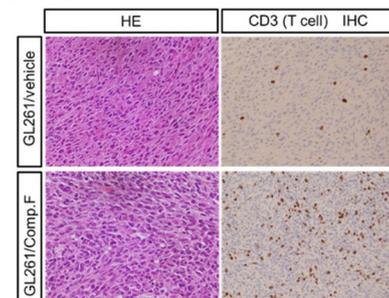
【図3】



に腫瘍組織に含まれるT細胞数の明らかな減少が認められ、腫瘍免疫の活性化が起こっている可能性を示唆する結果が得られた。

(5) Compound.Fはエネルギーセンサーとして知られているAMPKに結合している可能性がドッキングシミュレーション解析により示唆された。AMPKは癌悪性化に関わっていることが多くの癌細胞で明らかとなっており、Compound.Fをリード化合物とした誘導体を現在作成中である。

【図4】



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakamura Yawara, Inoue Akihiro, Nishikawa Masahiro, Ohnishi Takanori, Yano Hajime, Kanemura Yonehiro, Ohtsuka Yoshihiro, Ozaki Saya, Kusakabe Kosuke, Suehiro Satoshi, Yamashita Daisuke, Shigekawa Seiji, Watanabe Hideaki, Kitazawa Riko, Tanaka Junya, Kunieda Takeharu	4. 巻 164
2. 論文標題 Quantitative measurement of peritumoral concentrations of glutamate, N-acetyl aspartate, and lactate on magnetic resonance spectroscopy predicts glioblastoma-related refractory epilepsy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Neurochirurgica	6. 最初と最後の頁 3253 ~ 3266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00701-022-05363-y	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 Inoue Akihiro, Watanabe Hideaki, Kondo Takuya, Katayama Eiji, Miyazaki Yukihiro, Suehiro Satoshi, Yamashita Daisuke, Taniwaki Mashio, Kurata Mie, Shigekawa Seiji, Kitazawa Riko, Kunieda Takeharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Usefulness of intraoperative rapid immunohistochemistry in the surgical treatment of brain tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropathology	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) 10.1111/neup.12864	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 Ozaki S, Umakoshi A, Yano H, Ohsumi S, Sumida Y, Hayase E, Usa E, Islam A, Choudhury Mohammed E., Nishi Y, Yamashita D, Ohtsuka Y, Nishikawa M, Inoue A, Suehiro S, Kuwabara J, Watanabe H, Takada Y, Watanabe Y, Nakano I, Kunieda T, Tanaka J	4. 巻 23
2. 論文標題 Chloride intracellular channel protein 2 is secreted and inhibits MMP14 activity, while preventing tumor cell invasion and metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 754 ~ 765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neo.2021.06.001	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 -

1. 著者名 Achiha T, Kijima N, Kodama Y, Kagawa N, Kinoshita, Fujimoto Y, Nonaka M, Fukai J, Inoue A, Nishida N, Yamanaka T, Harada A, Mori K, Tsuyuguchi N, Uda T, Ishibashi K, Tomogane Y, Sakamoto D, Shofuda T, Yoshioka E, Kanematsu D, Mano M, Luu B, Taylor D, Kanemura Y, Kishima H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Activated leukocyte cell adhesion molecule expression correlates with the WNT subgroup in medulloblastoma and is involved in regulating tumor cell proliferation and invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243272	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 Nishikawa M, Inoue A, Ohnishi T, Yano H, Ozaki S, Kanemura Y, Matsumoto S, Suehiro S, Ohtsuka Y, Kohno S, Ohue S, Shigekawa S, Watanabe H, Kitazawa R, Tanaka J, Kunieda T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hypoxia-regulated expression of CD44 and osteopontin can change the phenotype of glioma stem-like cells from highly invasive to less invasive/proliferative tumors in glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 2013-2025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-72809/v1	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 Tanaka J, Takahashi H, Yano H, Nakanishi H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of CSF1-Independent Ramified Microglia-Like Cells from Leptomeninges In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 24-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10010024	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 Inoue Akihiro, Ohnishi Takanori, Nishikawa Masahiro, Watanabe Hideaki, Kusakabe Kosuke, Taniwaki Mashio, Yano Hajime, Ohtsuka Yoshihiro, Matsumoto Shirabe, Suehiro Satoshi, Yamashita Daisuke, Shigekawa Seiji, Takahashi Hisaaki, Kitazawa Riko, Tanaka Junya, Kunieda Takeharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of CD44 as a Reliable Biomarker for Glioblastoma Invasion: Based on Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopic Analysis of 5-Amino-levulinic Acid Fluorescence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2369 ~ 2369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11092369	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 Inoue Akihiro, Ohnishi Takanori, Nishikawa Masahiro, Ohtsuka Yoshihiro, Kusakabe Kosuke, Yano Hajime, Tanaka Junya, Kunieda Takeharu	4. 巻 15
2. 論文標題 A Narrative Review on CD44 's Role in Glioblastoma Invasion, Proliferation, and Tumor Recurrence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4898 ~ 4898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15194898	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8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上明宏、片山英司、近藤拓弥、末廣諭、山下大介、重川誠二、渡邊英昭、北澤理子、國枝武治
2. 発表標題 脳神経外科領域における術中迅速免疫組織診断の有用性
3. 学会等名 第40回 日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上明宏、西川真弘、大西丘倫、矢野元、大塚祥浩、中村和、日下部公資、末廣諭、山下大介、渡邊英昭、田中潤也、國枝武治
2. 発表標題 膠芽腫摘出における真のGROSS TOTAL RESECTIONを獲得するための取り組み～浸潤部を見極める最適な手段とは～
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第81回学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上明宏、西川真弘、大塚祥浩、日下部公資、大西丘倫、矢野元、末廣諭、山下大介、渡邊英昭、田中潤也、國枝武治
2. 発表標題 当院の膠芽腫摘出における腫瘍浸潤部を見極めるための取り組み
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上明宏、西川真弘、矢野元、北澤理子、大西丘倫、渡邊英昭、田中潤也、國枝武治
2. 発表標題 膠芽腫再発に関わるGlioma stem-like cellの分子病態：異なる酸素環境下でのCD44とOsteopontinの働きから
3. 学会等名 第39回 日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上明宏、西川真弘、大西丘倫、矢野元、大塚祥浩、末廣諭、山下大介、渡邊英昭、田中潤也、國枝武治
2. 発表標題 膠芽腫における効果的な Bevacizumab治療のためのバイオマーカーの同定：膠芽腫幹細胞マーカーCD44はBeverizumabの治療抵抗性を予測する
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上明宏、末廣諭、福島万奈、北澤理子、渡邊英昭、國枝武治
2. 発表標題 Multicentric Gliomaとして発見されたEpithelioid Glioblastomaの1例
3. 学会等名 第38回 日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上明宏、末廣諭、尾崎沙耶、渡邊英昭、西川真弘、高野昌平、大西丘倫、大上史朗、渡邊英昭、國枝武治
2. 発表標題 膠芽腫摘出術におけるMethionine-PETの意義：Met 集積率と浸潤性腫瘍幹細胞の関連性
3. 学会等名 第38回 日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上明宏、西川真弘、日下部公資、矢野元、末廣諭、山下大介、渡邊英昭、田中潤也、大西丘倫、國枝武治
2. 発表標題 膠芽腫のSupra-total resectionを可能とする最新の手術支援技術：腫瘍浸潤領域に存在する腫瘍幹細胞の同定
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第82回学術総会
4. 発表年 2023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	井上 明宏 (Inoue Akihiro) (20593403)	愛媛大学・医学部附属病院・講師 (16301)	

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