

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21653

研究課題名（和文）神経線維腫症 型のcutaneous neurofibromaに対する外用薬開発

研究課題名（英文）Development of a topical treatment for cutaneous neurofibromatosis type I

研究代表者

森本 尚樹（MORIMOTO, NAOKI）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40378641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：神経線維腫症 型:NF1モデルとして、細胞レベルでMEK inhibitorの影響をより詳細に検討した。NF1細胞株は持続的にERKが活性化していること、selmetinib（MEK inhibitor）で増殖およびMAPK経路が阻害されること、またその際に必要な至適濃度を求めた。その結果、NF1細胞によるMEK経路阻害の評価モデルを確立した。MEK経路阻害によりNF1細胞の増殖が止まる詳細なメカニズムが明らかになりつつある。さらに新規阻害剤との併用での作用を検討し、従来品のselmetinibとの併用で高いMEK pathwayの阻害効果を示すことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Selmetinib単剤およびGSK690693の併用でのNF1不死化細胞株の細胞増殖への影響について、併用の場合、Selmetinib単剤に比較しERK経路が強く抑制された。今後NF1の治療において、Selmetinibが無効か効果不十分の場合の二剤併用療法や、各薬剤の投与量を抑えながらの治療の可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：As a model of neurofibromatosis type I: NF1, we investigated the effects of MEK inhibitor at the cellular level in more detail: the NF1 cell line has persistent ERK activation, proliferation and the MAPK pathway are inhibited by selmetinib (MEK inhibitor), and the optimal concentration required for this was optimal concentrations were determined. As a result, a model for evaluation of MEK pathway inhibition by NF1 cells was established, and the detailed mechanism by which MEK pathway inhibition halts NF1 cell proliferation is becoming clear. Furthermore, we investigated the action in combination with a new inhibitor and found that the combination with the conventional product, selmetinib, showed high inhibition of the MEK pathway.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：神経線維腫

1. 研究開始当初の背景

神経線維腫症 型(NF1)は Ras/MAPK 経路と PI3K/AKT 経路が活性化され、全身に多彩な症候を呈する常染色体優性遺伝疾患である。約 3500 人に 1 人の割合で出生し、遺伝疾患の中では比較的頻度が高いとされている。NF1 に特徴的な神経線維腫は plexiform neurofibroma(pNF)と cutaneous neurofibroma(cNF)があるが、NF1 の 95%に合併する cNF は未だに外科的切除以外の治療がなく、根治できておらず可及的な手術加療を行うのみとなっている。手術加療以外の治療法として、最近、海外では pNF に対して inhibitor of MAPK/ERK kinase(MEK 阻害剤)が有用であると報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、外科的切除以外に治療薬のない cNF に対して、この MEK 阻害剤を用いた、副作用の少ない世界初の外用薬を開発することを目標としていた。しかし研究開始が遅れたこと、また、NF1 モデルマウスを用いて MEK 阻害剤の有効性を検討する予定であったが、NF1 マウスが研究開始後、想定以上に高額であり、本研究に割り当てられた予算内では購入できないことが判明したことが実験の遅れとなった。このような状況のため、NF1 マウスの購入は本研究の枠内としては断念した。次に、NF1 患者手術検体から、cNF を採取し、患者由来の cNF 細胞培養を行うことを実施することとしたが、これは手術症例数が COVID19 感染症の影響により激減したため断念した。そこで、不死化 NF1 細胞株である hTERT NF1 ipNF05.5 細胞をモデルとし、将来患者検体が得られた際の評価系の確立も目的として NF1 のシグナル伝達機構について研究することとした。

NF1 の原因遺伝子より産生される Neurofibromin は細胞内のシグナル伝達経路において Ras タンパク質を恒常的に活性化することより、Ras /MAPK /MAPK /MAPK 経路と PI3K/AKT PI3K/AKTPI3K/AKT 経路の活性化を生じることが知られているが詳しい機構は不明な点が多い。そこで、MAPK 経路と AKT 経路の下流にある共通分子 CyclinD1 に着目して CyclinD1 の減少による、NF1 の細胞増殖抑制を明らかにし、NF1 の分子メカニズム解明に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

既報として NF1 null mice を使用して、代表的な細胞内情報伝達物質であるサイクリック AMP(cAMP)が、NF1 の遺伝子変異に応じて増加し、それに伴って CyclinD1 の発現が増加することが報告されている (H A Kim et al, The Journal of Neuroscience, 2001) American Type Culture Collection(ATCC)から入手できる、NF1 細胞の不死化株である、hTERT NF1 ipNF05.5 細胞を入手した。この不死化細胞株をモデルとし MAPK 経路の阻害剤として selmetinib、PI3K/Akt 経路の阻害剤として GSK690693 を使用して単剤における細胞増殖抑制効果を WST-8 アッセイで確認した。また、2 剤併用による細胞増殖抑制効果を確認した。さらに最も影響が大きい阻害剤と濃度を使用し、細胞内シグナル伝達に与える影響をウエスタンブロットングにより次のターゲットを評価することで確認した。MAPK 経路: P-ERK, total-ERK, CyclinD1, PI3K/Akt 経路 : CyclinD1 細胞はデータシート記載の通りに培養を行った。WST-8 アッセイは 450nm 吸光度を VersaMax マイクロプレートリーダーで測定した。ウエスタンブロットングは細胞を RIPA バッファーで溶解し回収、超音波処理を行った後、BCA Protein Assay によりタンパク濃度を測定した。SDS-Page 電気泳動およびニトロセルロース膜への転写には Xcell Blot Module を使用した。Cell Signaling Technologies 社の一次抗体反応は 4 時間、over night で行った。二次抗体には HRP 標識抗体を用い、ECL 反応により蛍光を LAS-3000 で検出することでバンドの撮影を行った。

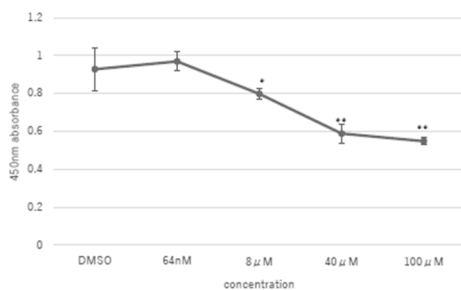
4. 研究成果

単剤での viability assay において、selmetinib 40 μ M で対象群 (DMSO のみ) と比較し有意に増殖抑制が見られ、100 μ M としても効果は頭打ちになった (図 1)。同様に GSK690693 では 10 μ M で対象群 (DMSO のみ) と比較し有意に増殖抑制が見られ、100 μ M で効果は頭打ちになった (図 2)。この条件を採用し、Cyclin D1 の発現量を Western Blotting で評価したところ、selmetinib 投与で Cyclin D1 のバンドが認められなかった。ERK についても活性化していないことが示された。また、GSK690693 投与では Cyclin D1 の発現を弱く抑制したことが示された一方、ERK については逆に活性化していることが示された。

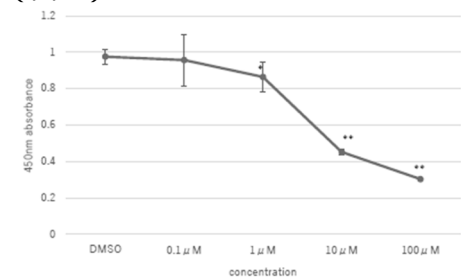
selmetinib と GSK690693 の同時投与条件での viability assay を行うと、selmetinib 40 μ M と GSK690693 同時投与群で各単剤と比較し、非常に強い増殖抑制効果を認めた (図 3)。この条件で Cyclin D1 の Western Blotting を行うと、同時投与群では Cyclin D1 のバンドが全く認められなかった一方、ERK についても全くバンドが検出されなかった。

以上の結果より、NF1-/-細胞モデルにおいて、既報の selmetinib による MEK 経路の阻害だけでなく GSK690693 により AKT 経路をも阻害することにより、さらなる cell viability の顕著な減少と標的分子の CyclinD1 の減少が認められた。

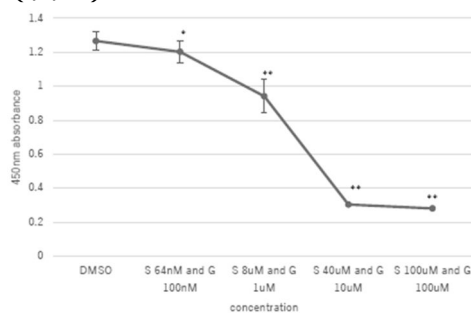
これらのことから、現在米国をはじめ治験が行われている selmetinib 単剤のみによる治療と比較し、GSK690693 併用により NF1 細胞増殖作用を抑制する効果をもつあるいはより低い濃度での治療が可能になることが示唆された。



(図 1)



(図 2)



(図 3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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

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