

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592117

研究課題名(和文)悪性グリオーマの浸潤シグナルを狙った分子標的療法の確立

研究課題名(英文)Molecular targeted therapy focusing invasion signaling in malignant glioma cell

研究代表者

中田 光俊(NAKADA, MITSUTOSHI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20334774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膠芽腫に対するAkt阻害剤、Notch阻害剤の併用療法の有用性とGSK3 阻害によるテモゾロミド(TMZ)薬剤感受性亢進メカニズムを検討した。Akt阻害剤、Notch阻害剤両者の併用により細胞浸潤抑制効果は増強されたが、増殖抑制効果はAkt単独添加と同程度にとどまった。併用療法は増殖抑制には効果が少ないが浸潤抑制には効果的であることが示唆された。TMZとGSK3 阻害試薬の併用は相加的、相乗的な細胞増殖抑制効果を示した。GSK3 阻害によるTMZに対する膠芽腫細胞の感受性増強作用は、c-Mycを介してMGMT promoterのメチル化が促進されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We assessed the therapeutic possibility of inhibiting Notch and Akt in gliomas using the clinically available, selective small molecule inhibitors. Additionally, we investigated the molecular mechanisms of sensitization of glioblastoma (GBM) cells to temozolomide (TMZ) by GSK3beta inhibition. Notch and Akt inhibitors significantly inhibited cell growth, migration, and invasion in a dose-dependent manner. However, the effect of combination treatment did not exceed that of Akt inhibitor monotherapy in proliferation assay. Inhibition of invasion, further enhanced by combination therapy. Therefore, combination therapy may be effective for inhibiting invasion but not proliferation. GSK3beta inhibition enhanced TMZ effect. c-Myc binds to the MGMT promoter with consequent recruitment of DNMT3A, regulating the levels of MGMT promoter methylation. Therefore, GSK3beta inhibition enhances TMZ effect by silencing MGMT expression via c-Myc-mediated promoter methylation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：グリオーマ 分子標的療法 Akt Notch 増殖 浸潤

1. 研究開始当初の背景

近年の医療技術の発展によりヒト癌の治療成績は急速に改善している。しかしながら脳原発腫瘍である膠芽腫は依然根治不能な悪性腫瘍であり、その悲惨な治療成績は30年以上前からほとんど変わっていない。膠芽腫は周囲の正常脳に対して浸潤性に増殖する特徴があり、外科的手術が常に絶対非治癒切除に終わる点で他臓器癌の治療と比較すると圧倒的に不利な状況に立たされている。したがって、手術後の放射線療法や化学療法は残存腫瘍の再発予防に必須である。とりわけ本腫瘍の予後を改善させるには新たな化学療法薬剤の開発が重要である。膠芽腫に対して欧米では分子標的薬剤を使用した臨床試験が盛んに行われている。現在、標準治療薬として使用されているアルキル化剤 temozolomide (TMZ)は、DNA 修復酵素である O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) の発現が高いほどその効果は低く、MGMT promoter 領域がメチル化されている場合は発現が抑制され TMZ の効果が高い。

2. 研究の目的

膠芽腫に対する多くの標的分子のうち、Akt、Notch は膠芽腫細胞の増殖や浸潤に密接に関連する。本研究では Akt 阻害剤、Notch 阻害剤の併用療法の有用性を検討した。

一方、我々は Akt、Notch と同様にグリコゲンシンターゼキナーゼ(GSK)3β が膠芽腫の悪性形質維持に重要とこれまでに報告している。GSK3β は糖代謝の経路で発見されたセリン・スレオニンキナーゼで糖代謝をはじめ細胞周期、増殖・分化、アポトーシスなどを制御することが知られている。現在までの検討で膠芽腫細胞株や膠芽腫組織において活性化型 GSK3β が過剰発現し、GSK3β の活性阻害により膠芽腫細胞の生存や増殖が抑制されることが明らかになっている。本研究では GSK3β 阻害による TMZ に対する膠芽腫細胞の感受性増強作用とそのメカニズムを解析した。

3. 研究の方法

臨床試験に使用されている Akt 阻害剤：MK-2206 と Notch 阻害剤：MRK-003 を使用した。Akt 阻害剤：MK-2206、Notch 阻害剤：MRK-003 を使用した。GSK3β 阻害には実験試薬 AR-A014418 を使用した。MK-2206 と MRK-003 の単独あるいは併用添加による膠芽腫細胞株 (U87, U251) に対する効果を Alamar Blue 増殖アッセイと Boyden chamber 浸潤アッセイで評価した。

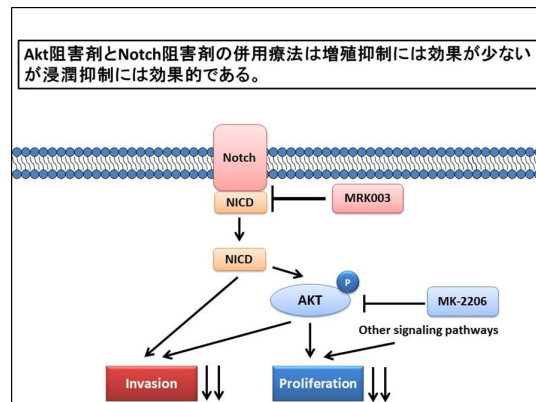
4 種類の膠芽腫細胞株を用いて AR-A014418 による TMZ 感受性増強効果を調べ、MGMT promoter のメチル化の変化観察および MGMT promoter に結合する分子を同定するために Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を行った。

4 種類の膠芽腫細胞株 (T98G, U138, U251,

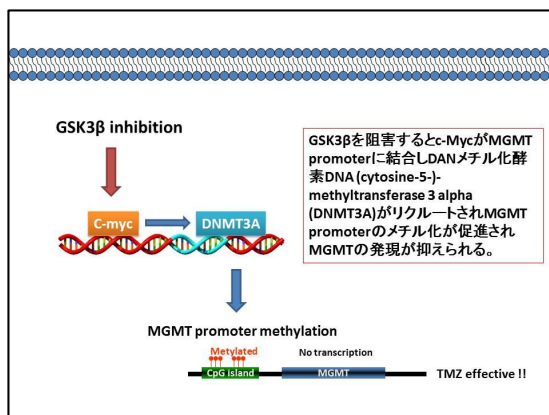
U87)を用いて GSK3β の特異的小分子阻害剤 (AR-A014418) および small interfering RNA (siRNA)による TMZ 感受性増強効果を増殖アッセイによって調べた。MGMT promoter のメチル化の変化観察のために methylation-specific polymerase chain reaction (MSP)、メチル化の定量のために MethyLight assay、MGMT 発現量の定量のために定量的 RT-PCR、MGMT promoter に結合する分子を同定するために Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を行った。

4. 研究成果

MK-2206 は膠芽腫細胞株 (U87, U251) の Akt リン酸化を効率よく阻害した。MRK003 は Notch シグナルを抑制するのみならず Akt のリン酸化も濃度依存性に阻害した。両者の併用により Akt リン酸化の阻害効果は増強された。両者のいずれの単独使用でも膠芽腫細胞株の増殖・浸潤は濃度依存性に抑制された。併用により細胞浸潤抑制効果は Akt リン酸化阻害依存性に増強されたが、増殖抑制効果は Akt 単独添加と同程度にとどまり Akt リン酸化非依存性であった。



膠芽腫細胞株において TMZ と AR-A014418 の併用は相加的、相乗的な細胞増殖抑制効果を示した。AR-A014418 により MGMT promoter のメチル化は促進し MGMT の発現は抑えられた。そのメカニズムとして c-Myc が MGMT promoter に結合し DNMT3A (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha) がリクルートされることが明らかとなった。



以上のことから Akt 阻害剤と Notch 阻害剤の併用療法は膠芽腫細胞株に対して増殖抑制には効果が少ないが浸潤抑制には効果的であることが示唆された。GSK3 $\beta$  阻害によるテモゾロミドに対する膠芽腫細胞の感受性増強作用は、c-Myc を介して MGMT promoter のメチル化が促進され MGMT の発現が抑えられることに起因することを明らかにした。これは膠芽腫に対してテモゾロミドと併用する GSK3 $\beta$  阻害療法の正当性を支持する科学的基盤となる結果である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1. Furuta T, Nakada M, Ueda F, Watanabe T, Arakawa Y, Higashi R, Hashimoto M, Nitta H, Hayashi Y, Hamada JI. Prognostic paradox: Brain damage around the glioblastoma resection cavity. *J Neurooncol* [Epub ahead of print] March 7. 2014. 10.1007/s11060-014-1418-1 査読有
2. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Hamada JI. The mechanism of insensitivity against tyrosine kinase inhibitors in malignant glioma. *Brain Tumor Pathol* [Epub ahead of print] Jan 8. 2014. 10.1007/s10014-013-0174-9 査読有
3. Sabit H, Nakada M, Furuta T, Watanabe T, Hayashi Y, Sato H, Kato Y, Hamada JI. Characterizing invading glioma cells based on IDH1-R132H and Ki-67 immunofluorescence. *Brain Tumor Pathol* [Epub ahead of print] Jan 3. 2014. 10.1007/s10014-013-0172-y 査読有
4. Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Nasu-Koyama R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Otani R, Saito N, Akiyama T. PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. *BBRC* 444: 13-18, 2014. 10.1016/j.bbrc.2013.12.138 査読有
5. Furuta T, Nakada M, Masaki K, Sato Y, Hayashi Y, Nakanuma Y, Hamada JI. Molecular analysis of a recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. *Brain Tumor Pathology* 31: 32-39, 2014. 10.1007/s10014-013-0142-4 査読有
6. Teng L, Nakada M, Furuyama N, Sabit H, Furuta T, Hayashi Y, Takino T, Dong Y, Sato H, Sai Y, Miyamoto KI, Berens ME, Zhao SG, Hamada JI. Ligand-dependent EphB1 signaling suppresses glioma invasion and correlates with patient survival. *Neuro-Oncology* 15: 1710-1720, 2013. 10.1093/neuonc/not128 査読有
7. Pyko IV, Nakada M, Sabit H, Teng L, Furuyama N, Hayashi Y, Kawakami K, Minamoto T, Fedulau AS, Hamada JI. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling. *Carcinogenesis* 34: 2206-2217, 2013. 10.1093/carcin/bgt182 査読有
8. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, Hirao A, Hamada JI. Integrin  $\alpha 3$  is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer* 108: 2516-2524, 2013. 10.1007/978-94-007-4719-7\_8 査読有
9. 中田光俊, 源利成. 多機能キナーゼ GSK3 $\beta$  を標的とした膠芽腫治療. *癌と化学療法* 41, 2014 査読無
10. Yoshikawa A, Nakada M, Watanabe T, Hayashi Y, Sabit H, Kato Y, Suzuki S, Ooi A, Sato H, Hamada JI. Progressive adult primary glioblastoma in the medulla oblongata with an unmethylated MGMT promoter and without an IDH mutation. *Brain Tumor Pathol* [Epub ahead of print] Sep 28. 2012. 10.1007/s10014-012-0118-9 査読有
11. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto KI, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. *PLoS One* 8: e55289, 2013 [Epub ahead of print] Feb 8. 2013. 10.1371/journal.pone.0055289. 査読有
12. Nakada M, Kita D, Teng L, Pyko IV, Watanabe T, Hayashi Y, Hamada JI. Receptor tyrosine kinases: principles and functions in glioma invasion. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 986:143-70, 2013. 10.1007/978-94-007-4719-7\_8 査読有
13. Jin R, Nakada M, Teng L, Furuta T, Sabit H, Hayashi Y, Demuth T, Hirao A, Sato H, Zhao G, Hamada JI. Combination therapy using Notch and Akt inhibitors is effective for suppressing invasion but not proliferation in

glioma cells. *Neuroscience letters* 534: 316-321, 2012. 10.1016/j.neulet.2012.12.008. 査読有

14. Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada JI. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Frontiers in Radiation Oncology* 2: 98, 2012. 10.3389/fonc.2012.00098. 査読有

[学会発表](計 23 件)

1. Nakada M, Furuta T, Sabit H, Chikano Y, Hayashi Y, Sato H, Minamoto T, Hamada JI. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  promotes glioma invasion via the FAK/Rac1/JNK/MMP2 pathway. 4<sup>rd</sup> Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, November 21-24, 2013, Marriott Marquis Hotel, San Francisco, CA, USA
2. 中田光俊, 田中慎吾, 小淵航, 大槻純男, 古田拓也, 宮下勝吉, 林裕, 寺崎哲也, 濱田潤一郎. 絶対定量プロテオミクスによる膠芽腫のサブタイプ分類と臨床的意義. 第 14 回日本分子脳神経外科学会, 平成 25 年 10 月 18 日-19 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
3. 中田光俊, 林裕, 古田拓也, 宮下勝吉, 淑瑠へムラサビット, ピコイリア, 田中慎吾, 喜多大輔, 毛利正直, 林康彦, 内山尚之, 源利成, 濱田潤一郎. 多機能キナーゼ GSK3 $\beta$  を標的とした膠芽腫治療の基礎と臨床. 第 72 回日本脳神経外科学会総会, 平成 25 年 10 月 16 日-18 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
4. 中田光俊, ピコイリア, 淑瑠へムラサビット, 林裕, 源利成, 濱田潤一郎. GSK3 $\beta$  inhibition sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by MGMT promoter methylation via c-Myc signaling. 第 72 回日本癌学会学術総会, 平成 25 年 10 月 3 日-5 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
5. 中田光俊, 田中慎吾, 宮下勝吉, 林裕, 濱田潤一郎. 膠芽腫の摘出率増加による生存期間延長効果の検証 テモゾロミドが与える影響 (シンポジウム). 第 18 回日本脳腫瘍の外科学会, 平成 25 年 9 月 19 日-20 日, 大津プリンスホテル(大津)
6. 中田光俊. ドラッグリポジショニング: 再発膠芽腫に対する GSK3 $\beta$  阻害医薬品の適用 (招待講演). 第 2 回 Neuro-Oncology WEST, 平成 25 年 9 月 14 日, ホテルニューオータニ大阪(大阪)
7. Nakada M. Drug Repositioning in

Neuro-Oncology: GSK3 $\beta$  Inhibiting Drugs for Recurrent GBM (Invited Lecture). XV WFNS World Congress of Neurosurgery, September 8-13, 2013, Coex Convention Center, Seoul, Korea

8. Nakada M, Jin R, Furuta T, Sabit H, Hayashi Y, Hamada JI. Concurrent inhibition of Notch and Akt signaling effectively suppresses invasion in glioma cells. XV WFNS World Congress of Neurosurgery, September 8-13, 2013, Coex Convention Center, Seoul, Korea
9. 中田光俊, 田中慎吾, 宮下勝吉, 林裕, 濱田潤一郎. テモゾロミド認可前後での膠芽腫の摘出率と生存期間の関係. 第 45 回ニューロ・オンコロジーの会, 平成 25 年 7 月 28 日, 東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設(TWIns)(東京都新宿区)
10. 中田光俊, 片平拓磨, 馮甜甜, 林裕, 渡辺哲陽, 米山猛, 濱田潤一郎. 共焦点レーザー顕微鏡による 5-ALA 蛍光ガイド下摘出膠芽腫組織の蛍光局在の観察. 第 10 回日本脳神経外科光線力学学会, 平成 25 年 6 月 22 日, 江陽グランドホテル(仙台)
11. 中田光俊, 片平拓磨, 馮甜甜, 林裕, 渡辺哲陽, 米山猛, 濱田潤一郎. 共焦点顕微鏡を用いた蛍光強度定量化による術中腫瘍浸潤領域同定の試み. 第 29 回日本脳腫瘍病理学会, 平成 25 年 5 月 24 日-25 日, KFC Hall 国際ファッションセンター(東京都墨田区)
12. Nakada M, Hayashi Y, Hamada JI. Integrin  $\alpha$ 3 overexpressing in glioma stem-like cells plays a role in invasion. 10th Meeting for the Asian Society for Neuro-Oncology, March 21-24, 2013, Taj Mahal Palace & Tower, Mumbai, India
13. 中田光俊. 悪性脳腫瘍に対するトランスレイショナルリサーチ (招待講演). 第 9 回信濃町脳腫瘍セミナー, 平成 25 年 2 月 16 日, 慶應義塾大学病院 新教育棟 4F 講堂 3(東京都新宿区)
14. 中田光俊, 林裕, 小淵航, 大槻純男, 田中慎吾, 古田拓也, 渡邊卓也, 寺崎哲也, 濱田潤一郎. 絶対定量プロテオミクスによる膠芽腫のサブタイプ分類. 第 30 回日本脳腫瘍学会, 平成 24 年 11 月 25 日-27 日, グランドプリンスホテル広島(広島)
15. Nakada M, Hayashi Y, Miyashita K, Kinoshita M, Furuta T, Sabit H, Kita D, Hayashi Y, Uchiyama N, Kawakami K, Minamoto T, Hamada JI. Phase I/II study for

- recurrent glioblastoma with the drugs inhibiting GSK3 $\beta$ . Society for Neuro-Oncology 17th Annual Meeting 2011, November 15-18, 2012, Hilton Hotel, Washington DC, USA
16. 中田光俊、林裕、宮下勝吉、木下雅史、古田拓也、淑瑠へムラサビット、喜多大輔、林康彦、内山尚之、川上和之、源利成、瀧田潤一郎. GSK3 $\beta$  阻害作用を有する既存薬剤を用いた再発膠芽腫治療の第 I・II 相臨床試験. 第 50 回日本癌治療学会学術集会, 平成 24 年 10 月 25 日-27 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
  17. 中田光俊、林裕、小淵航、大槻純男、古田拓也、木下雅史、渡邊卓也、田中慎吾、喜多大輔、宮下勝吉、淑瑠へムラサビット、毛利正直、林康彦、内山尚之、寺崎哲也、瀧田潤一郎. 絶対定量プロテオミクスを使用した膠芽腫のプロファイリングとテラーメイド分子標的療法の提唱. 第 71 回日本脳神経外科学会総会, 平成 24 年 10 月 17 日-19 日, 大阪国際会議場(大阪)
  18. 中田光俊、金日華、藤雷、古田拓也、淑瑠へムラサビット、林裕、佐藤博、瀧田潤一郎. 膠芽腫細胞株に対する Akt 阻害剤と Notch 阻害剤の併用効果. 第 13 回日本分子脳神経外科学会, 平成 24 年 9 月 20 日-21 日, 熊本市国際交流会館(熊本)
  19. 中田光俊. 膠芽腫に対する新規薬物治療の可能性 (キーノートレクチャー), 第 13 回日本分子脳神経外科学会, 平成 24 年 9 月 20 日-21 日, 熊本市国際交流会館(熊本)
  20. Nakada M. GSK3 $\beta$  as a new therapeutic target for glioblastoma. –from bench to bedside- (Invited Lecture). The 5th Harbin International Neurosurgical Conference, July 13-15, 2012, Academic lecture hall in the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, China
  21. Nakada M, Niska JR, Nambu E, Furuyama N, Hayashi Y, Kita D, Hayashi Y, Berens ME, Hamada JI. Molecular target profiling by absolute quantitative proteomics in glioblastoma. The 19<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research & Therapy, June 22-24, 2012, Marriott Gateway on the Falls, Niagara Falls, Canada
  22. Nakada M, Hayashi Y, Obuchi W, Ohtsuki S, Tanaka S, Furuta T, Sabit H, Sato H, Terasaki T, Hamada JI. Absolute quantitative proteomics-based molecular diagnosis for glioblastoma. (Workshop), The 4th International Symposium of Brain Tumor Pathology, May 24-26, 2012, 名古屋国際会議場(愛知)
  23. Nakada M, Chikano Y, Sabit H, Furuta T, Miyashita K, Hayashi Y, Sato H, Kawakami K, Minamoto T, Hamada JI. Aberrant glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is involved in glioma invasion. 9<sup>th</sup> Meeting for the Asian Society for Neuro-Oncology, April 20-22 2012, Taipei International Convention Center, Taiwan
- 〔図書〕(計 2 件)
1. Nakada M, Kita D, Furuta T, Watanabe T, Hayashi Y, Hamada JI. Signaling cascades driving the malignant phenotype of glioma cells. *Glioma Cell Biology*, ed. Aleks Sedo and Rolf Mentlein, Springer, 2014 in press
  2. Teng L, Nakada M, Hayashi Y, Yoneyama T, Zhao SG, Hamada JI. Current applications of 5-ALA in glioma diagnostics and therapy. *Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors*, ed. Terry Lichtor, InTech, 249-261, 2013
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 2 件)
- 名称: 腫瘍領域判別装置及び腫瘍領域判別方法  
発明者: 米山猛、中田光俊、林裕、渡邊哲陽、香川博之、瀧田潤一郎  
権利者: 金沢大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-091034  
出願年月日: 2013 年 4 月 24 日  
国内外の別: 国内
- 名称: 膵臓癌治療剤  
発明者: 島崎猛夫、中田光俊、源利成  
権利者: 金沢医科大学、金沢大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-093072  
出願年月日: 2013 年 4 月 25 日  
国内外の別: 国内
- 取得状況(計 0 件)
- なし
- 〔その他〕  
ホームページ等  
金沢大学医薬保健研究域医学系脳・脊髄機能制御学ホームページ  
<http://neurosurgery.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中田 光俊 (NAKADA MITSUTOSHI )  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：20334774

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

源 利成 (MINAMOTO TOSHINARI )  
金沢大学・がん研究所・教授  
研究者番号：50239323

佐藤 博 (SATO HIROSHI )  
金沢大学・がん研究所・教授  
研究者番号：00115239