

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592130

研究課題名(和文)ナトリウムイオン/プロトン交換輸送体1抑制による神経膠腫細胞浸潤制御

研究課題名(英文)Suppressive control of glioma invasions via inhibition of sodium ion/proton exchanger 1

研究代表者

矢野 元 (Yano, Hajime)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00284414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫の有効な新規治療法の開発を目指し、すでに有望な知見が得られていた5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) の腫瘍細胞浸潤抑制活性の利用を企図した前臨床試験データの蓄積と、産業化を見据えた企業との連携を模索した。EIPA の作用機序の探索において、特徴的な血管が神経膠腫細胞浸潤に寄与することを見出し、さらにその過程に TGF- β 1 の活性化過程が関与することの示唆を得た。また EIPA の標的であるナトリウムイオン/プロトン交換輸送体1 が、他のがん転移にも寄与することを見出したことで、EIPA をがん浸潤抑制治療に用いることの蓋然性の補強をも得た。

研究成果の概要(英文)：Preclinical evaluations for the development of a novel anti-tumor invasion medicine by utilization of 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) which had exhibited promising potential in vitro were performed, aiming at developing a novel powerful therapy against gliomas of which treatment has long been unimproved. On the way of the explorations of modes of action of EIPA, a characteristic blood vessel was found to contribute to the glioma cell invasions, and an implication that activation process of TGF β 1 may participate in this step was obtained. Furthermore, the validity to consider EIPA as an anti-tumor invasion medicine was confirmed from the observation of contributions of the target of EIPA sodium ion/proton exchanger1 (NHE1) on lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma cells (SCC). Highly metastatic subline-cell of a SCC acquired enhanced expression of NHE1 compared with the non-metastatic parental cell line, and knockdown of NHE1 reduced the metastasis.

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：神経膠腫 潜行性浸潤 ナトリウムイオン/プロトン交換輸送体1 EIPA TGF β 1 シグナル

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫の難治性は、その潜行性の浸潤に負うところが大きい。すなわち外科的切除を免れたわずかな浸潤細胞が再発を呼び、生命予後を悪からしめている。そのため「浸潤抑制治療」が実現するならば、この難治性は改善できると期待されて久しい。しかしながら、神経膠腫に限らず、これまでに「がん浸潤抑制剤」というものがいまだ実用化された例はない。大きな期待を集めて広く臨床研究が行われたマトリックスメタロプロテアーゼ抑制剤が、その期待に応えられなかったことは広く知られている (Coussense et al. *Science* 295, 2387-2392, 2002)。

神経膠腫治療を困難にしている要因として、その病形の多様さをもあげることができる。神経膠腫が形態学的・遺伝学的に多様であることは広く知られた事柄であるが、“浸潤の様式”という問題意識に基づいた研究は少なくとも文献的には見当たらない。申請者等は、浸潤の誘引という観点においてすくなくとも数種類の様式が存在することを見いだしたことから、これらに共通に有効な標的を見いだすことに留意してきた。本研究で対象とするナトリウムイオン/プロトン交換輸送体 1 ($\text{Na}^+ - \text{H}^+$ Exchanger 1 (NHE1)) はこうした問題意識から見いだした。NHE1 は、細胞内 pH (pHi) 制御の主たるプレイヤーのひとつであるとともに、その細胞内ドメインにアクチン細胞骨格アダプターを介してアンカーするためのモチーフを持ち、アクチン細胞骨格の細胞膜への連結に寄与することで、二系統の細胞内シグナル系の統御点として機能している (Baumgartner et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287, C844-850, 2004)。

2. 研究の目的

「がん浸潤抑制剤」は一般的・実質的にいまだ日の目を見たことがない。そして特に現在においても、神経膠腫は実質的に不治の病である。NHE1 阻害剤として古くから使用される 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)-amiloride (EIPA) がある。本研究ではこれをリード化合物様に用いて、神経膠腫の新規治療法の実用化へ向けた道筋をつけるために、創薬展開を目指した基礎的知見の蓄積を得ること目的とした。このことは既に出願済みの特許内容の増強にも資する。これらのデータをもって、創薬展開のための企業との連携関係を構築することも目指した。

3. 研究の方法

(1) EIPA の作用機序の解析

研究開始時までには得られていた、神経膠腫細胞潜行性浸潤マウスモデルにおける EIPA の浸潤抑制効果が、神経膠腫細胞のみに対して作用しているのか、宿主側のマウス脳側の要因にも何らかの影響を及ぼしているのか、形態学的・生化学的に検討・考察した。

モデルマウス脳切片を作成し、浸潤している神経膠腫細胞周辺の構造を種々の染色により解析した。また発現している可能性のあったサイトカインの発現量を、定量的 RT-PCR 法により測定、検討した。

(2) 患者試料の検討

愛媛大学医学部附属病院脳神経外科を受診している神経膠腫患者生検組織中の NHE1 発現量を定量的 RT-PCR 法により測定、検討した。

(3) 他がんでの事例の検討

高転移性頭頸部扁平上皮がん細胞株である SASL1m と、その親株で非転移性の SAS 細胞において、定量的 RT-PCR 法により NHE1 発現を測定、検討した。また恒常的 NHE1 ノックダウン SASL1m 細胞を作成し、その *in vivo* モデルにおける転移性、および *in vitro* における浸潤性の測定を行った。

(4) 企業との連携の模索

本技術の実用化を目指すうえで不可欠な、製薬企業との連携を模索するため、製薬企業各社との接触を試みた。

4. 研究成果

(1) EIPA の作用機序の解析

EIPA に目的効果があることは前臨床的には明確であるが、その作用機序がある程度解明されていないと、創薬ひいては医薬品としての認可における重大な障害となる。そのためこの問題にウエイトを置いて取り組んでいるが、今般一つの大きな成果が得られた。このことは今後の研究・事業化においても重要な指針を与えるものである。

i) 血管の関与

グリオーマ細胞の浸潤像を詳細に解析することで、NHE1 およびネスチン陽性の管状の成分が浸潤細胞塊に含まれていることを見出した。血管内皮に結合するトマトレクチンによる染色や、血管内皮細胞において GFP が恒常的に発現するトランスジェニック動物における NHE1 染色解析から、NHE1 が血管において発現することを確認した (図 1)。すなわちグリオーマ細胞の潜行性浸潤は、その少なくとも一部は血管を介していることが判明した。

ii) その血管の性状

その血管がどういった性状を持つか検討するため、C6 グリオーマ細胞を GFP 標識して動物モデルを作成し、種々の細胞表面マーカーにて血管を染色して検討したところ、グリオーマ細胞と共存しているのは圧倒的に CD105 陽性血管

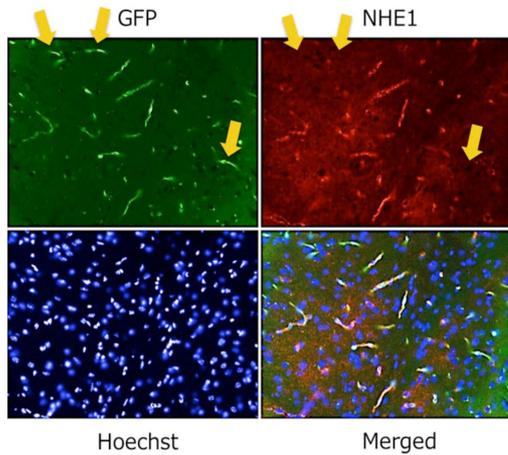


図1 Ftk1-EGFP マウス能における NHE1 染色 (赤)
GFP 陽性の構造が血管、Hoechst にて核染色
矢印の血管は NHE1 陰性

であった (図 2 a)。重要なことに、血管新生においては VEGF が重要な役割を果たすが、その血管における主要な受容体である VEGFR2 (CD309) 陽性血管はグリオーマ細胞とほとんど共存していなかった (図 2 b)。CD105 は別名 Endoglin と呼ばれ、その実体は主として TGFβ1 および 3 を受容する III 型 TGFβ 受容体である。

iii) TGFβ の関与

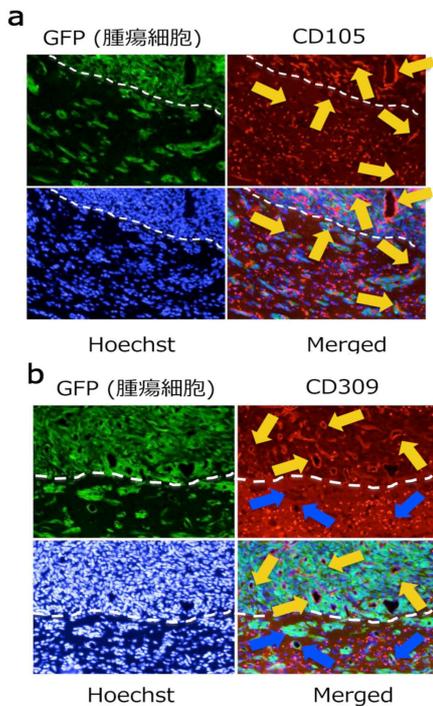


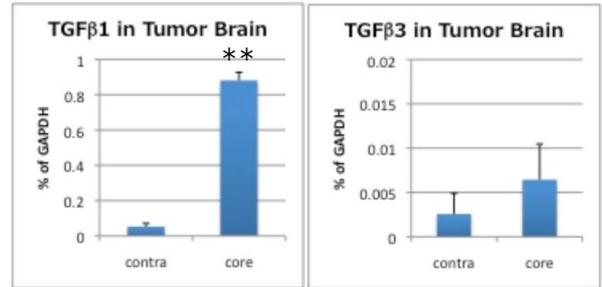
図2 浸潤したグリオーマ細胞と共存する血管
a: CD105 (Endoglin), b: CD309 (VEGFR2) 染色
点線は腫瘍塊の境界部 黄色矢印は染色陽性血管
青色矢印は腫瘍細胞と共存しない血管

すなわち、グリオーマ細胞の潜行性浸潤においてより多大に寄与するのは TGFβ 受容体陽性血管であり、したがってその形成については潜行性グリオーマ細胞浸潤を惹起するうえで TGFβ1 もしくは 3 が重要な寄与をなしている可能性が示された。

iv) グリオーマ組織を形成する細胞成分と

TGFβ の由来について

以上のことからグリオーマ組織における TGFβ 発現が想定されるが、事実すでに多くの報告がなされているし、われわれのモデル系においても C6 グリオーマ細胞を移植した脳半球における TGFβ1 および 3 の発現亢進 (ただし圧倒的に 1 が優位である)



** : P < 0.01 vs contra
図4 定量的 RT-PCR による、腫瘍脳中での TGFβ1 および 3 の mRNA 発現
core: 腫瘍存在半球, contra: 腫瘍非存在半球

が観察された (図 4)。しかしながらグリオーマ組織を仔細に観察すると、その構成成分がグリオーマ細胞のみではないことも知られている。特徴的なことに、グリオーマ組織塊の内部にはマクロファージ様の細胞が相当数共存しており、しかしながらグリオーマ組織内は炎症状態になく、腫瘍細胞の貪食も行っていない。これらのマクロファージ様細胞は tumor-associated macrophage (TAM) と呼ばれ、その機能がどのようにして変調されているのかが、現在当該領域の重要な研究課題ともなっている。われわれのモデル系においても、移植した C6 細胞とともに TAM が相当数共存していることが確認される (図 5)。TAM を初代培養に供し、C6 との比較においてそ

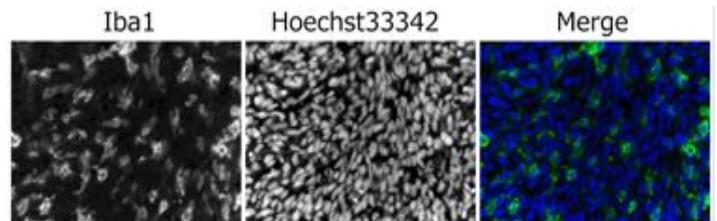


図5 グリオーマ腫瘍塊中に共存するマクロファージ様細胞
Iba1: マクロファージマーカー染色 (緑)
腫瘍塊を形成する細胞の 30-40 % を占めていると概算できる

の TGFβ1 発現を qRT-PCR にて測定したところ、TAM が圧倒的に優位に発現していた (図 6)。

v) TGFβ 測定系の構築および、その活性化への NHE1 の寄与

TGFβ は非常に特徴的な活性制御を受けるサイトカインである。細胞から

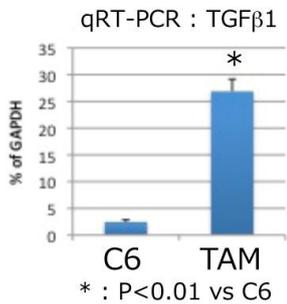


図6 C6細胞およびTAMにおけるTGFβ1発現比較

分泌される際は共役蛋白質と結合した不活性型として産生される。一部はすぐに活性化されて機能するが、多くはその形状で細胞外基質に取り込まれ、蓄積される。のち酵素的に切断されて活性型として利用されると考えられている。活性化に寄与する酵素として、マトリクスメタロプロテアーゼなどが想定されているが、その活性化機構にはいまだ不明な点が多い。われわれにとっては、作成したグリオーマ組織で実際に活性型のTGFβが機能しているのか、またその活性化にNHE1が寄与しているか、が非常に興味深い問題として浮上してきた。現在TGFβ活性測定系を構築中である。

(2) 患者試料の検討

愛媛大学病院脳神経外科受診、脳腫瘍患者資料におけるNHE1遺伝子発現を定量的RT-PCR法にて測定、検討した(図7)。40%

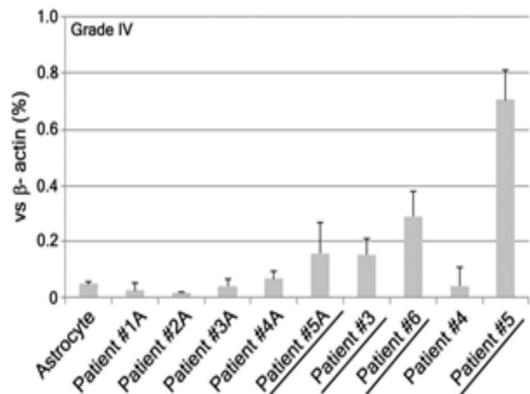


図7 グリオーマ患者組織におけるNHE1 mRNA発現

のグレード4グリオーマ患者において(10例中下線の4例)NHE1発現亢進を見た。この結果を、米国国立がん研究所(NCI)が開示している脳腫瘍患者遺伝子発現データベース(Rembrandt解析)の情報に照らし合わせたところ、同等もしくは当院において、よりNHE1発現亢進と悪性度の関連が強く相関していることが示された。こうしたデータは、企業化を促進するうえでの有用な傍証となる。

(3) 他がんでの事例の検討 - 頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移におけるNHE1の

寄与の解析

NHE1ががんの進行において実際に重要な標的たるということを示すために、計画していた頭頸部扁平上皮がんにおける解析を並行して行い、以下の結果を得た。

i) 転移性扁平上皮がん細胞におけるNHE1発現亢進

転移性扁平上皮がん細胞であるSASL1mにおけるNHE1発現を、非転移性の親株であるSAS細胞と比較したところ、その亢進およびそれに伴うMatrigel chamber測定における*in vitro*浸潤性の亢進を見出した(図8a,b)。

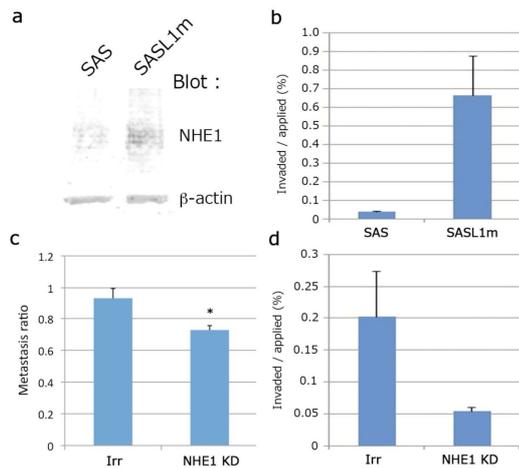


図8 転移性頭頸部扁平上皮がん細胞SASL1mにおけるNHE1発現亢進と恒常的NHE1ノックダウンによるリンパ節転移および浸潤性の低下
a: 非転移性SAS細胞に対するSASL1m細胞のNHE1発現亢進のイムノブロットによる解析、b: SASL1m細胞における高浸潤性の獲得、c: SASL1m細胞における恒常的NHE1ノックダウンによる転移性の低下、d: 浸潤性の低下

ii) その恒常的ノックダウン細胞が示す転移性の低下

このNHE1発現亢進がSASL1m細胞の悪性形質と相関するか否かを査定するため、NHE1に対するshRNAを発現するレンチウイルスベクターを構築し、その導入による恒常的ノックダウン細胞を樹立した。すでに樹立しているリンパ節転移測定系に本細胞をかけたところ、転移性の減少を観察した(図8c)。腫瘍細胞の悪性形質とNHE1発現亢進については近年急激に報告が増えているが、リンパ節転移への関与は渉獵する限り一報の類似報告が見られるのみで、またその報告においては次項に示すようなメカニズム解析は見られず、今般のわれわれの知見の新規性は高い。これを受けて論文報告の準備に入っている。

iii) その分子機構としての*in vitro*浸潤性の低下

腫瘍細胞リンパ節転移へのNHE1の寄与のメカニズムは、これまでのわれわれの想定からすると組織浸潤性の亢

進である。そのことを査定したところ、上記のノックダウン細胞において浸潤性が低下していることを確認した(図 8 d)。

こうした知見は、ますますもって NHE1 を治療標的・研究標的とするものの意義・蓋然性の高さを支持しており、学術的価値のみならず、今後実用化に向けた企業との折衝においても有意な情報が得られたこととなった。

(4) 企業との連携の模索

中外製薬、住友製薬、アステラス製薬等の製薬会社とコンタクトし、最終的にアステラス製薬からの化合物供与を得た。中外製薬では NHE1 阻害剤自体の開発経験がないことから化合物供与は得られなかったが、製薬業界内で流通している化合物情報の供与を得たため、他社へのコンタクトが可能となった。それらの多くは、本研究開発とは異なる心疾患を標的とした開発歴のある化合物であり、種々の理由で開発が断念されたものであった。こうした化合物の多くはその枯渇を理由に供与を受けられなかったが、上記のとおりアステラスのみの協力が得られた。

本化合物の効果は EIPA とほぼ同等であったが、EIPA と異なり指向性が観察された。すなわち、細胞による浸潤抑制効果の強弱が EIPA よりも大きかった。実際の産業化においては、より広範な腫瘍に対して効果的な化合物が有用と考えられるため、この結果は化合物開発における基礎的データとして重要なものとなった。

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 4 件)

すべて査読あり

1. Activated microglia in a rat stroke model express NG2 proteoglycan in peri-infarct tissue through the involvement of TGF- β 1. Sugimoto, K., Nishioka, R., Ikeda, A., Mise, A., Takahashi, H., Yano, H., Kumon, Y., Ohnishi, T., and Tanaka, J. *Glia*, **62**, 185-198, 2013.
2. Expression of MCP-1 and fractalkine on endothelial cells and astrocytes may contribute to the invasion and migration of brain macrophages in ischemic rat brain lesions. Tei, N., Tanaka, J., Sugimoto, K., Nishihara, T., Nishioka, R., Takahashi, H., Yano, H., Matsumoto, S., Ohue, S., Watanabe, H., Kumon, T., and Ohnishi, T. *J. Neurosci. Res.* **91**, 681-693 (2013).
3. Oct3/4 promotes migration and invasion of glioblastoma cells. Kobayashi, K., Takahashi,

H., Inoue, A., Harada, H., Toshimori, S., Kobayashi, Y., Goto, K., Sugimoto, K., Yano, H., Ohnishi, T., and Tanaka, J. *J. Cell. Biochem.* **113**, 508-517 (2012).

4. Premetastatic vasculogenesis in oral squamous cell carcinoma xenograft-draining lymph nodes. Mayorca-Guiliani, A, E., Yano, H., Nakashiro, K., Hamakawa, H., and Tanaka, J. *Oral Oncology* **48**, 663-758 (2012).

[学会発表](計 11 件)

1. Haruna Yaguchi, Kohei Shiota, Takefumi Shimoda, Hajime Yano, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, and Junya Tanaka, Contributions of TGF β 1 on insidious glioma cell invasions in the experimental glioma and exploration of the source of the TGF β 1, 第 91 回日本生理学会、鹿児島市、3 月 16-18 日、2014 年
2. Noriko Nomura, Haruna Yaguchi, Kohei Shiota, Takefumi Shimoda, Hajime Yano, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, and Junya Tanaka, Exploration of the mechanism of TGF β 1 production from glioma associated macrophage-like cells in experimental glioma, 第 91 回日本生理学会、鹿児島市、3 月 16-18 日、2014 年
3. Hajime Yano, Teppei Kaminota, Noriko Nomura, Yusuke Kobayashi, Yui Kirino, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, and Junya Tanaka, Suppression of draining lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma by inhibition of the factors secreted from primary tumor site at pre-metastatic phase, 第 91 回日本生理学会、鹿児島市、3 月 16-18 日、2014 年
4. 矢口明那、下田健文、塩田浩平、矢野元、グリオーマ潜行性浸潤モデルの構築と NHE1 阻害による潜行性浸潤抑制、第 23 回日本病態生理学会、東京都、8 月 3-4 日、2013 年
5. 矢野元、野村倫子、矢口明那、下田健文、塩田浩平、神経膠腫病巣内に浸潤する脳マクロファージ様細胞における ナトリウムイオン/プロトン交換輸送体 1 の役割の解析、東京都、8 月 3-4 日、2013 年
6. Haruna Yaguchi, Takefumi Shimoda, Kohei Shiota, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano and Junya Tanaka, Na⁺/H⁺ Exchanger 1 (NHE1) as a molecular target to suppress glioblastoma invasion. 第 90 回日本生理学会、東京都、3 月 27-29 日、2013 年

7. Noriko Nomura, Haruna Yaguchi, Kohei Shiota, Takefumi Shimoda, **Hajime Yano**, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, and Junya Tanaka, Exploration of the mechanism of TGFβ1 production from glioma associated macrophage-like cells in experimental glioma, 第 90 回日本生理学会、東京都、3 月 27-29 日、2013 年
8. Kohei Shiota, Alejandro Mayorca Guilliani, Haruna Yaguchi, Takefumi Shimoda, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, **Hajime Yano** and Junya Tanaka, An attempt of anti-metastasis therapy based on analyses of pre-metastatic microenvironmental reconstruction in target lymph node upon squamous cell carcinoma metastasis. 第 90 回日本生理学会、東京都、3 月 27-29 日、2013 年
9. 矢口明那、下田健文、塩田浩平、**矢野元** 杉本香奈、高橋寿明、田中潤也、ナトリウムイオン / プロトン交換輸送体 1 (NHE1) を標的とした神経膠腫細胞浸潤抑制治療の試み、第 64 回日本生理学会中四国地方会、2012、高知市、10 月 27-28 日、2012 年
10. 下田健文、矢口明那、塩田浩平、**矢野元** 杉本香奈、高橋寿明、田中潤也、神経膠腫細胞浸潤抑制における 5-(*N-ethyl-N-isopropyl*)-amiloride (EIPA) の作用機序の解析、第 64 回日本生理学会中四国地方会、2012、高知市、10 月 27-28 日、2012 年
11. 塩田浩平、**矢野元**、Alejandro Mayorca Guilliani, 杉本香奈、高橋寿明、田中潤也、扁平上皮がんのリンパ節転移に先立転移標的組織構築改変とがん細胞浸潤性の関連について 第 22 回日本病態生理学会、大分市、8 月 3-4 日、2012 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hgyano.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 元 (Yano, Hajime)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00284414

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし