

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592703

研究課題名(和文) 神経芽腫における TrkB を標的とした新規治療薬の探索とその機能解析

研究課題名(英文) Identification of novel candidate chemical compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma

研究代表者

中村 洋子 (Nakamura, Yohko)

千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター・主席研究員

研究者番号：60260254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：難治性神経芽腫の治癒率向上のために、新しい観点からの分子標的治療薬の開発を試みることを目的とした。TrkBを標的としたインシリコのスクリーニングから得られた低分子化合物により、PARPやCaspase 9の断片化、p53のリン酸化が認められ、p53を介した細胞死の誘導が示唆された。またBDNFによるTrkBのリン酸化により、TrkBのBDNF結合領域はBDNFと低分子化合物で競合し合っていることが示唆された。CHP134細胞をマウスに移植した動物実験では、低分子化合物による抗腫瘍効果が認められた。以上の結果より、神経芽腫におけるTrkBを標的とした新しい抗腫瘍候補となる低分子化合物を見出した。

研究成果の概要(英文)：The neurotrophin receptor TrkB and its ligand BDNF are expressed at high levels in high-risk NBs and are involved in defining the poor prognosis of the patients. We performed an in silico screening procedure utilizing an AutoDock/grid computing technology in order to identify novel small chemical compounds targeting the BDNF binding domain of TrkB. We have finally identified seven compounds that kill NB cells. The TUNEL assay showed that these molecules induce apoptosis accompanied by p53 activation in NB cell lines. The candidate compounds and BDNF demonstrated an antagonistic effect on cell growth, invasion and colony formation, possibly suggesting competition at the BDNF binding site of TrkB. The candidate compounds had tumor suppressive activity in xenograft and in vivo toxicity tests using mice. Using in silico Docking screening we have found new candidate TrkB inhibitors against high-risk NBs, which could lead to new anti-cancer drugs.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経芽腫 TrkB 低分子化合物 BDNF 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、交感神経節や副腎といった神経堤細胞が集まる場所に生じる最も代表的な小児がんの一種である。しかし、その生物学および臨床学的な性質は症例ごとに様々である。実際、1歳以下の患児に発症した神経芽腫は自然に退縮する傾向を示すのに対して、1歳以降に発見された神経芽腫は悪性度が高く、1番染色体短腕の末端欠失、がん遺伝子 MYCN の増幅あるいは17番染色体長腕の付加といった複数のゲノム異常がしばしば認められ、これらが神経芽腫の予後不良性に寄与すると考えられている (Evans AE. et al., Natl. Cancer Inst. Monogr., 44:49-54, 1976, Brodeur GM. et al., Nat. Rev. Cancer 3:203-216, 2003, Tomioka N., Nakamura Y., Nakagawara A. et al., Oncogene, 27:441-449, 2008)。

我々のこれまでの研究から、神経増殖因子 (NGF, BDNF, NT-4/5) およびそのレセプター (TrkA, TrkB) の細胞内シグナルが神経芽腫の増殖、分化およびプログラムされた神経細胞死を制御することが示唆されている (Nakagawara A., Med. Pediatr. Oncol., Review, 31:113-115, 1998, Nakagawara A., Cancer Lett., 169:107-114, 2001)。予後良好な神経芽腫では TrkA の高発現が認められ、そのような腫瘍は、がんの退縮に繋がる神経細胞死を引き起こすか、あるいは良性の神経節腫へと分化する能力を保持していると考えられる。一方で、TrkB は予後不良の神経芽腫で高発現しており、BDNF や NT-4/5 と結合して autocrine あるいは paracrine 的に腫瘍増殖や薬剤耐性、血管新生を促進することから、がん細胞の転移・浸潤に関わることが示唆されている (Nakagawara et al., N. Engl. J. Med., 328:847-854, 1993, Nakagawara et al., Mol. Cell. Biol., 1994)。

これまでの神経芽腫の治療法には手術療法や化学療法があるが、抗がん剤としては、主にビンクリスチン、シクロホスファミド、イホスファミド、ドキシソルビシン、ピラルビシン、シスプラチン、カルボプラチン、エトポシド等が使用されており、これらを組み合わせた多剤併用療法が行われている。TrkB の細胞内ドメインにタイロシンカイネース領域があり、タイロシンキナーゼ阻害剤である K-252a は、細胞の増殖を抑制し、神経分化を誘導する作用がある (Maroney AC et al., J Neurochem., 64:540-548, 1995)。

しかし、この作用は、TrkB の細胞内ドメインを介して起きており、そのため、抗がん剤としてはある程度高濃度での治療が求められ、副作用が強く生じ易い。そこで、予後不良な神経芽腫で発現の高い TrkB 遺伝子の BDNF が結合する領域を標的とした新規の治療薬を見出すことを目的とし、さらにその作用機序を明らかにする。BDNF が結合する領域は、細胞外ドメインにあり、より低濃度の抗がん剤で効果が得られる可能性があるため

この領域を標的とした。

## 2. 研究の目的

小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い神経芽腫の約3分の2は進行神経芽腫であり、治療法の飛躍的進歩にもかかわらず5年生存率は50%を切っている。これまで薬剤治療には既存の化学療法剤が使用されているが、効果が不十分であり副作用の問題もある。したがって、難治性神経芽腫の治療率向上のために、新しい観点からの分子標的治療薬の開発を試みることを目的とし、さらにその作用機序を解明する。具体的に、予後不良な神経芽腫で発現の高い遺伝子 TrkB (神経栄養因子受容体) の BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) が結合する領域を標的分子として、すでに300万個の候補低分子化合物仮想ライブラリーから、インシリコで60個の低分子化合物をスクリーニングした。その結果候補となった低分子化合物の中で、細胞増殖抑制能に影響を与える化合物をさらにスクリーニングし、がん細胞の増殖抑制や分化制御に関わる最適化合物の探索を行い、その作用機序を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

薬剤の標的は、予後不良な神経芽腫で高発現している TrkB 遺伝子の BDNF が結合する領域とし、候補化合物についてコンビナトリアルケミストリーの技術により、化合物を合成評価しリードコンパウンドとなる薬剤を探索し、その作用機序をも明らかにする。

大きく分けて以下の3項目に添って実験を進めた。

(1) すでに薬剤候補となった60個の低分子化合物が、がん細胞の増殖抑制や分化制御にどのように関与しているのか解析を行った。ウエスタンブロット法、TUNEL アッセイ法による解析を行った。

(2) 細胞増殖抑制能の認められた低分子化合物の生体毒性を検討するため、化合物をマウスに単回強制経口投与および単回静脈内投与し生体毒性試験を検討した。また、薬剤候補となった低分子化合物について動物実験での抗腫瘍効果の検討を行った。具体的には、スキッドマウスに CHP134 細胞 (神経芽腫細胞株) を移植し、形成された腫瘍に対して低分子化合物を腹腔内投与し抗腫瘍効果を検討した。

(3) より効果的な薬剤を得るため、抗腫瘍効果の認められた低分子化合物の構造を一部修飾し、細胞増殖抑性能を検討した。

## 4. 研究成果

インシリコでスクリーニングされた低分子化合物60個のうち入手可能な化合物37個について、神経芽腫細胞株 [SH-SY5Y/TrkB および CHP134 (TrkB 発現あり)] に対する細胞増殖抑制能を検討したところ、両細胞とも化

化合物処理に伴って細胞増殖抑制能が顕著に認められた化合物は7個であった。また、IC50は、0.07~4.6 $\mu$ Mであった。さらに、どのようなシグナル伝達経路を介して細胞死や細胞分化等が起きているか解析を行ったところ、TUNEL アッセイ法では化合物処理により細胞は陽性染まり、ウエスタンブロット法ではPARPやCaspase 9の断片化が検出され、さらには、p53のリン酸化が認められた。以上の結果から、p53を介した細胞死を誘導していることが示唆された。またSY5Y/TrkB細胞を化合物と同時にBDNF処理し、BDNF存在下、非存在下において、細胞増殖抑制速度を比較検討したところ、BDNF存在下の方が、細胞の増殖抑制速度は、遅くなっていることが判った。TrkBのBDNF結合領域をBDNFと低分子化合物で競合していると考えられたことから、SY5Y/TrkB細胞をBDNFで処理したときのTrkBリン酸化が、低分子化合物によりどのような影響を与えるか検討した。その結果、BDNF処理のみではTrkBのリン酸化が顕著に認められたが、低分子化合物の存在下でBDNF処理するとTrkBのリン酸化は抑制されることが判明した。また、細胞増殖抑制能が顕著に認められた7個の低分子化合物のうち、より細胞増殖抑制能を示した化合物について原子や官能基を一部変換した低分子化合物を作成し、細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、構造を一部変換する前の低分子化合物に比べ、変換した化合物は、細胞増殖抑制効果が大きいことが明らかとなった。

候補となった低分子化合物7個に生体毒性がないか、マウスを用いた毒性試験を行ったところ、生体毒性は認められなかった。

さらに、CHP134細胞をスキッドマウスに移植し、形成される腫瘍の形状、大きさを測定し、組織学的染色等により腫瘍組織の特徴を検討し、腫瘍形成が明らかであるマウスに対し低分子化合物を処理した。その結果、低分子化合物による抗腫瘍効果が認められた。

神経芽腫細胞株[SH-SY5Y/TrkB (TrkB過剰発現細胞株)]に対する細胞増殖能を検討する中で、化合物処理(10 $\mu$ M)により細胞増殖能が顕著に認められた化合物を2個見出した。この2つの化合物について、細胞の集密度をIncucyteで測定し細胞増殖率の指標とした。処理濃度は0~1.0 $\mu$ Mとした。その結果、低分子化合物処理によりSH-SY5Y/TrkB細胞の増殖を促進することが判明した。TrkBは、新皮質、海馬など脳において広く分布しており、神経変性モデルでの役割が示されている。当該化合物がTrkBシグナル活性を誘導するか検討するため、低分子化合物(0~1.0 $\mu$ M)をマウスの腹腔内に投与し、マウスの大脳皮質および海馬より蛋白質を抽出しウエスタンブロット法を行った。その結果、低分子化合物処理によりTrkB、AKTおよびERKのリン酸化が顕著に認められTrkBシグナルを活性化することが示唆された。インシリコによりスクリーニングされた低分子化合物

より、TrkBを発現している細胞の増殖を促進または抑制する化合物を見出すことが出来た。

#### 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8件)

- 1) Tatsumi Y, Takano R, Islam MS, Yokochi T, Itami M, Nakamura Y, Nakagawara A. BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis. *Cell Death Dis.* 6:e1607, 2015. doi: 10.1038/cddis.2014.568. 査読有
- 2) Nakamura Y, Suganami A, Fukuda M, Hasan MK, Yokochi T, Takatori A, Satoh S, Hoshino T, Tamura Y, Nakagawara A. Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Med.* 3:25-35, 2014. doi: 10.1002/cam4.175. 査読有
- 3) Suenaga Y, Islam SM, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibata T, Nakamura Y, Ohira M, Haraguchi S, Takatori A, Nakagawara A. NCYM, a Cis-antisense gene of MYCN, encodes a de novo evolved protein that inhibits GSK3 $\beta$  resulting in the stabilization of MYCN in human neuroblastomas. *PLoS Genet.* 10(1):e1003996. 2014. doi: 10.1371/journal.pgen.1003996. 査読有
- 4) Hasan MK, Nafady A, Takatori A, Kishida S, Ohira M, Suenaga Y, Hossain S, Akter J, Ogura A, Nakamura Y, Kadomatsu K, Nakagawara A. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci. Rep.* 3:3450. 2013. doi: 10.1038/srep03450. 査読有
- 5) Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma. *Oncogene* 33: 2601-2609. 2014. doi: 10.1038/onc.2013.221. 査読有
- 6) Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J. Clin. Invest.* 123:2935-2947. 2013. doi: 10.1172/JCI65988. 査読有
- 7) Asada K, Watanabe N, Nakamura Y, Ohira M, Westermann F, Schwab M, Nakagawara A, Ushijima T. Stronger Prognostic Power of the CpG Island Methylator Phenotype than Methylation of Individual Genes in

Neuroblastomas. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 43:641-645, 2013. doi: 10.1093/jjco/hyt058. 査読有

- 8) Hossain S, Takatori A, Nakamura Y, Suenaga Y, Kamijo T, Nakagawara A. NLRR1 enhances EGF-mediated MYCN induction in neuroblastoma and accelerates tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 72:4587-4596. 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0943. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 福田真佑、高取敦志、大平美紀、中村洋子、中川原章 NGF/TrkA signals are suppressed by Neuronal Leucine Rich Repeat Protein 1(NLRR1) in neuroblastoma. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014 年 11 月 30 日 岡山
- 2) Mayu Fukuda, Atsushi Takatori, Yohko Nakamura, Akira Nakagawara. Neuronal Leucine Rich Repeat Protein 1 (NLRR1) suppresses NGF/TrkA signal in neuroblastoma. The 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) 2014 年 10 月 25 日 カナダ・トロント
- 3) 福田真佑、高取敦志、中村洋子、中川原章 Neuronal Leucine Rich Repeat Protein 1 (NLRR1) protein represses NGF-dependent cell growth in neuroblastoma cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 27 日 横浜
- 4) Yohko Nakamura, Akiko Suganami, Mayu Fukuda, MD. Kamrul Hasan, Tomoki Yokochi, Atsushi Takatori, Tyuji Hoshino, Yutaka Tamura, and Akira Nakagawara. Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma: in silico screening utilizing a grid computing technology. *Advanced Neuroblastoma Research (ANR) 2012.* 2012 年 6 月 18 日 -21 日 カナダ・トロント
- 5) Yohko Nakamura, Akiko suganami, Mayu Fukuda, MD. Kamrul Hasan, Tomoki Yokochi, Atsushi Takatori, Tyuji Hoshino, Yutaka Tamura, and Akira Nakagawara. Identification of novel candidate chemical compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日-21 日 札幌
- 6) 福田真佑、中村洋子、菅波晃子、Hasan MD. Kamrul、横地 智貴、高取敦志、星野忠次、田村裕、中川原章 TrkB を標的として神経芽腫のアポトーシスを誘導する新規候補化合物の in silico スクリーニングと機能解析 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜

- 7) Yohko Nakamura, Akiko Suganami, Mayu Fukuda, MD. Kamrul Hasan, Tomoki Yokochi, Atsushi Takatori, Shunpei Satoh, Tyuji Hoshino, Yutaka Tamura, and Akira Nakagawara. Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma: in silico screening utilizing a grid computing technology. *Advanced in Neuroblastoma Research Conference (ANR) 2014* 2014 年 5 月 16 日 ドイツ・ケルン

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 洋子 ( Nakamura Yohko )

研究者番号 : 60260254

### (2) 研究分担者

中川原 章 ( Nakagawara Akira )

研究者番号 : 50117181