

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791511

研究課題名(和文)脳腫瘍における分子標的薬感受性のメカニズム解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of the molecular target drugs in brain tumors.

研究代表者

森重 真毅 (MORISHIGE, MASAKI)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60381050

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)：神経膠芽腫において、悪性度を規定しているのは浸潤性にある。我々は、GEP100がEGFRと結合し、乳癌細胞の浸潤能を獲得させ、GEP100はVEGFRとも結合し、血管新生でも重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。近年、神経膠芽腫においても分子標的薬剤が臨床応用され始めている。神経膠芽腫細胞株のEGFR、VEGFR、GEP100の分子の状態を評価した結果、これら細胞株では、浸潤性と概ね相関したGEP100の蛋白発現量が観察された。臨床検体でもGEP100の発現はRTKの発現と一致する傾向であった。神経膠芽腫においてもGEP100は、分子標的薬の感受性に対する指標となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma multiforme (GBM) is the most invasive form in gliomas and extremely refractory to therapy. An investigation of the molecules regulating invasion will thus contribute to the GBM treatment. We have previously shown that GEP100 plays an important role in the invasive activities of human breast cancer. The GEP100, activated by receptor tyrosine kinases, appears to be common in angiogenesis and cancer invasion.

We here found that GEP100 is highly expressed in GBM cell lines correlated with invasive activity, and GEP100 tend to be expressed with RTK in GBM by immune-histochemical analysis. Our results indicate that GEP100 is one of the major components of GBM invasion.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経膠芽腫 浸潤 分子標的薬剤

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の中で最も悪性度が高いのが神経膠芽腫(Glioblastoma)である。悪性脳腫瘍を代表する神経膠芽腫は、様々な外科的治療、化学療法、放射線療法等が試みられてきているが、近年においてもなお著名な治療成績の向上に至っていない最も悪性度が高い脳腫瘍のひとつである。

現在、神経膠芽腫に標準治療として用いられている抗がん剤は、アルキル化剤であるテモゾロミドを代表とする DNA 損傷作用や細胞分裂阻害作用を有する細胞障害性薬剤である。その一方で、分子標的治療薬は、従来の DNA 合成阻害や細胞分裂の阻害といった細胞障害性抗がん剤に対し、細胞増殖の阻害やアポトーシスの誘導が主作用であり、近年の研究の進歩により、がん治療の重要な戦略のひとつとなってきている。

神経膠芽腫においても約 40-50% に EGFR(Epithelial Growth Factor Receptor)の増幅や過剰発現が認められており、VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor)などの、その他 Receptor Tyrosine Kinase も遺伝子変異や過剰発現が報告され、様々な分子標的治療薬が臨床応用され始めている。しかしながら、これら遺伝子異常は各々の症例ごとで多岐にわたり、また影響を受けるシグナル伝達の経路は様々で、他の情報伝達系ともクロストークしていることから、分子標的治療薬への感受性については未だ不明な点が多く残されている。脳腫瘍における分子標的治療薬の治療成績は、全体としてはこれまでの historical control と比較して著名な効果は得られていないが(文献 1,2,3)、個々の症例によっては著効例の報告も多く、副作用の比較的少ない分子標的薬は、今後の脳腫瘍の治療を進展させる上で重要であると考えられる。

また、がん治療抵抗性の要因の一つとして、癌細胞自身の genetic/epigenetic な変異の多段階的蓄積や腫瘍組織内の低酸素環境、それに導かれる血管新生、免疫細胞の集積、ストロマ細胞の活性化などといった微小環境の変化による浸潤形質の誘導といった多様性も挙げられる。今後、分子標的薬を用いてより高い抗腫瘍効果を引き出すには、これらの多様性に対する詳細な理解を深め、個々の症例に応じたより良いバイオマーカーを見出し、より有効な標的分子の選択や組み合わせに対する知見の集積が必要になる。

- 文献 1 . J Clin Oncol 25:3230-3237.2007.
文献 2 . J Neurooncol Epub ahead of print. 2009.
文献 3 . J Clin Oncol 26:5603-5609.2008.

2. 研究の目的

細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たす低分子量 G 蛋白質の 1 つである Arf6 は、その他の低分子量 G 蛋白質と同様に、GEF(guanine-nucleotide exchange factor)によって GTP 結合型に、GAP(GTPase activating protein)により GDP 型に変換されることで活性作用をもつ。申請者らは、Arf6 の GEF である GEP100 が EGFR の Ty1068、Ty1086 と特異的に結合し、Arf6 を活性化させた結果、E-cadherin による cell-cell adhesion を破綻させることで乳癌細胞が浸潤能を獲得するという分子メカニズムの一端を解明した。また、神経膠芽腫細胞株においても、EGFR-GEP100-Arf6 の経路が浸潤性の獲得に重要な機能を有している知見を得ている。さらに GEP100 は VEGFR とも結合し、血管内皮細胞の血管新生においても重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。(文献 4.5.6.7.)

これらのことより、GEP100 は浸潤性の高い神経膠芽腫を始めとし、hyper-vascularization を示す脳腫瘍においても重要な機能を果たしているのではないかと予想される。

Receptor Tyrosine Kinase と GEP100 の関連性は、我々が世界に先駆けて報告したものである。その上で、網羅的解析により、現行の分子標的薬をより有効に使用する基礎知見となり得れば、テーラーメイド医療に繋がるなど、治療抵抗性の脳腫瘍の治療成績向上に向け、医学的貢献度も大きい。また新たな分子標的としてのインターフェイスを見出す可能性ももつ。また、本研究で得られた分子標的薬感受性のメカニズムの知見を、他臓器癌に応用させることで広く癌に一般化し、さらなる臨床応用を目指すことも可能となる。

本研究では、脳腫瘍における、主に EGFR 阻害剤、VFEFGF 阻害剤を中心とした分子標的治療薬が GEP100 を含め報告のある下流の cascade に与える影響を解析し、分子標的治療薬の感受性に対する基礎的知見を得ることを目的とする。この結果を基に、より有効な分子標的薬の組み合わせを検討すると同時に、テーラーメイド医療に繋がる分子標的薬のバイオマーカーにつながる可能性を模索する。

- 文献 4 . PLoS One. 6(8): e23359. 2011
文献 5 . Traffic. 10(8):982-93.2009.
文献 6 . Cell Adh Migr. 2(2):71-73.2008.
文献 7 . Nat Cell Biol. 10(1):85-92.2008.

3. 研究の方法

まずは、神経膠芽腫において、GEP100-Arf6 を含め、これらシグナル伝達系がどのように変化しているかを分子生物学的的手法により検証する。

(1) 脳腫瘍細胞株での解析

代表的な悪性脳腫瘍である神経膠芽腫細胞株(CCF-STTG1、IN351、T98G、U251、U373、U87 など)の cell lysate を作成し、Western Blotting 法を用いて EGFR、VEGFR、GEP100 などの分子の発現状態を評価する。また、siRNA 導入を用いた RNAi により in vitro での浸潤能(Matrigel 透過性)・接着能 (collagen coated dish への接着能)・運動能 (micropore 透過性)・細胞外基質の分解能 (MMPs の活性) 等の詳細な機能解析を行い、発現量との相関を評価する。

(2) 移植モデルマウスの作成

動物生体内での機能評価の為、マウスの定位脳座標装置を用いた神経膠芽腫細胞株のヌードマウスの非機能脳皮質に移植するモデルマウス作成する。まずは、移植が可能であるかの検討から開始し、可能であった場合の natural curse から、動物実験の条件を決定する。

(3) 臨床検体での検討

より最適なバイオマーカーを得ることは、感受性の高い患者の選択や、至適投与量の設定に寄与すると考えられる。まずは、GEP100、EGFR などの臨床検体での病理標本の免疫染色を行ない、蛋白質レベルでの発現の解析を行なう。また、腫瘍組織内の微小環境の変化による浸潤形質の誘導といった多様性もあることから、腫瘍の部位によっても、各分子の発現様式は多岐に及ぶと考えられ、これらも含め詳細に評価する。

4. 研究成果

(1) 脳腫瘍細胞株での解析

臨床に利用されている分子標的薬剤が細胞内シグナルへ及ぼす影響を解析する為、代表的な悪性脳腫瘍である神経膠芽腫細胞株の EGFR、VEGFR、GEP100 などの分子の状態を評価した。

各種細胞株の cell lysate を作成し、各々の蛋白質の発現量を評価したところ、これら細胞株では、matrigel invasion assay での浸潤性と概ね相関した GEP100 の蛋白質発現量が観察された。

siRNA を用いて GEP100 の蛋白質発現を抑制することで、神経膠芽腫細胞株の浸潤能を抑制する知見を得ていたが、詳細な評価の結果、GEP100 の機能として、細胞の生存能力、細胞運動能には変化を与えないことが確認された。

(2) 移植モデルマウスの作成

また、動物生体内での機能評価の為、マウスの定位脳座標装置を用いた神経膠芽腫細胞株のヌードマウスの非機能脳皮質に移植するモデルマウス作成を開始し、数種類の細胞株で移植が可能であることを確認した。

(3) 臨床検体での検討

至適な条件検討を行った臨床検体の免疫染色では、神経膠芽腫の摘出組織に GEP100 の発現が確認された。

腫瘍組織内の低酸素環境、血管新生、免疫細胞の集積、ストローマ細胞の活性化などといった微小環境の変化による浸潤形質の誘導といった多様性もあることから、腫瘍の部位によっても、各分子の発現様式は多岐に及ぶと考えられる。GEP100 と RTK の発現部位が相関する傾向が観察され、神経膠芽腫においても GEP100 は、分子標的薬の感受性に対するより有効なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

今後、知見を深める為には、臨床経過(生存期間)との相関について多変量解析等を用いて検討することや、移植モデルマウスでの分子標的薬剤の効果や、上記蛋白質の発現評価など、より詳細な検討が必要である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森重 真毅 (MORISHIGE MASAKI)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60381050

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：