

令和元年5月29日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10756

研究課題名(和文) ドラッグ・リポジショニングによる悪性グリオーマの抗浸潤分子標的薬の開発

研究課題名(英文) Development of the anti-invasive drug for treatment of malignant glioma by drug-repositioning of anti-depressant.

研究代表者

阿部 匡史 (ABE, TADASHI)

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：60423282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマの治療において、腫瘍細胞の強い浸潤能が外科手術における有効な病巣の切除の妨げとなる。この浸潤能を抑制する目的で、グリオーマ細胞に対して抗浸潤作用を持つダイナミン阻害剤(抗うつ剤:フルボキサミン)をドラッグ・リポジショニングにより同定した。また、フルボキサミンをリード分子としてダイナミン阻害剤のスクリーニングを進めた。さらに、グリオーマ細胞の浸潤にはダイナミン-コルタクチン複合体によるアクチン線維束形成が重要であること、この束化の調節にはサイクリン依存性キナーゼによるコルタクチンのリン酸化が関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマでは、腫瘍細胞が強い浸潤能を持ち正常脳に深く浸入するため、有効な病巣の切除が困難になる。従って、腫瘍細胞の浸潤制御が治療戦略に重要である。本研究では、ドラッグ・リポジショニングから、安全性が確立し血液脳関門を通過できる抗うつ薬等から、独自に開発したスクリーニング法を用い「グリオーマ細胞に対する抗浸潤薬」としてフルボキサミンを同定した。このフルボキサミンをリード分子としてさらに有効な分子をスクリーニング中である。本研究から見いだされる抗浸潤薬は、効能の適応拡大が期待され、迅速かつ低費用な新薬開発に繋がる可能性が大きく、グリオーマの製薬治療分野に多大に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：For treatment of malignant glioma, highly invasive glioma cells become obstacle to surgical removal of primary tumor. To suppress the high invasive activity of glioma cells, we identified the novel anti-invasive drug, a fluvoxamine, by drug repositioning of anti-depressant. Screening for more potent anti-invasive drugs using fluvoxamine as a lead compound are currently in progress. Furthermore, we found that actin-bundling by dynamin-cortactin complex is required for glioma cell invasion. Cortactin is phosphorylated by cyclin dependent kinase 5 (CDK5), and its phosphorylation negatively regulates glioma cell invasion.

研究分野：生化学

キーワード：分子標的薬 グリオーマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、エンドサイトーシス関連分子ダイナミンがアクチン線維を束化することで腫瘍細胞の走化浸潤に必要な糸状仮足、葉状仮足の形成を制御すること、さらに、ダイナミン阻害剤は、腫瘍細胞の走化浸潤を強く抑制することを見いだした。この発見を端緒に、ダイナミンによるアクチン制御機構を標的とする抗浸潤剤の開発に着手した。この目的のため、*in vitro* で高効率にダイナミン阻害剤をスクリーニングできる系を構築した。

2. 研究の目的

グリオーマでは、腫瘍細胞が強い浸潤能を持ち正常脳に深く浸入するため、有効な病巣の切除が困難になる。従って、腫瘍細胞の浸潤制御が治療戦略に重要である。我々は、ダイナミンクリップによるアクチン線維の束化が、腫瘍細胞が浸潤する際の仮足形成に必須であることを発見した (山田ら BBRC 2009)。ダイナミン阻害剤は、アクチン線維束形成を強力に阻害し腫瘍細胞の浸潤を抑制することから、ダイナミンを標的とした抗浸潤剤を世界に先駆けて発表した (山田ら BBRC 2009:2014: 特許第 5283962)。これら知見から、グリオーマ細胞の浸潤抑制に著効するダイナミン阻害剤の開発に着手した。本研究は、既存脳内作動薬からグリオーマ抗浸潤作用を持つ分子を *in vitro* 及び *in vivo* で同定すると共に浸潤におけるダイナミンによるアクチン制御機構の全貌を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ細胞の浸潤を抑制する分子のスクリーニング

血液脳関門を通過できる抗うつ剤を中心とした分子から、グリオーマ細胞の浸潤を強く抑制するダイナミン阻害剤を同定する。既に構築したアクチン線維形成を指標にしたダイナミン阻害剤スクリーニング系を用いてスクリーニングする。

(2) ダイナミンの関わるグリオーマ細胞の浸潤機構を分子レベルで解析する。ラットグリオーマ由来 NG108-15 を用い、ダイナミンによるアクチン線維束形成と走化浸潤機構を生化学的、細胞生物学的に調べる。

4. 研究成果

(1) について、我々は、血液脳関門を通過できる抗うつ剤を中心に、アクチン線維形成を指標としたダイナミン阻害剤スクリーニング法から、グリオーマ細胞の浸潤を劇的に抑制するフルボキサミンを同定した。フルボキサミンをリード分子としてさらに有効な候補分子のスクリーニングを行った。さらに、フルボキサミンが、ヒト非小細胞肺癌細胞株 (H1299) においても有効であるのか検討した。H1299 は、血清刺激により激しくラッフル膜を形成する。フルボキサミンは、血清刺激によるラッフル膜形成を濃度依存的に強く阻害し細胞の遊走も創傷治癒アッセイによりその阻害効果を確認した。さらに、フルボキサミンの薬効とその構造相関を調べるため、側鎖の異なる誘導体を 12 種類合成し、*in vitro* アクチン線維形成評価法を用いて、その阻害効果を調べた。側鎖の違いで、アクチン線維形成の程度に差が見られ、構造最適化の重要なヒントが得られた。また、この分子は、H1299 の遊走も強く抑制した。今後、構造最適化に向けた分子設計も並行して行うと共に、詳細な細胞における効果を調べる予定である。

(2) について、ラットグリオーマ由来細胞株 (NG108-15) を用いて、ダイナミンによるアクチン線維束形成機構を調べた。これまでに、ダイナミンがアクチン線維結合タンパクであるコルタクチンとリング状複合体を形成すること、このリング状複合体が開閉して数本のアクチン線維を束ねることを発見していた。今回、cyclin-dependent-kinase5 (CDK5) がコルタクチンをリン酸化することによって、ダイナミン-コルタクチン複合体の崩壊を促進し、複合体のアクチン線維束化能を低下させることを発見した。細胞内では、CDK5 によるコルタクチンのリン酸化により葉状仮足、糸状仮足の形成が強く抑制されると共に、NG108-15 の migration も抑制された。これらの結果から、CDK5 は新たな抗グリオーマの分子標的になる可能性が示された。以上の結果をまとめて、国際腫瘍学雑誌 (阿部ら Int J Oncol 2019) に発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Abe T, The Mon La, Miyagaki Y, Oya E, Wei FY, Sumida K, Fujise K, Takeda T, Tomizawa K, Takei K, Yamada H

Phosphorylation of cortactin by cyclin-dependent kinase 5 modulates actin bundling by the dynamin 1-cortactin ring-like complex and formation of filopodia and lamellipodia in NG108-15 glioma-derived cells

International journal of oncology 査読有 54(2):550-558 (2019)

DOI:10.3892/ijo.2018.4663

Takeda T, Kozai T, Yang H, Ishikuro D, Seyama K, Kumagai Y, Abe T, Yamada H, Uchihashi T, Ando T, Takei K

Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin helices regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis

eLife 査読有 7 (2018)
DOI:10.7554/eLife.30246

Hayashi K, Michiue H, Yamada H, Takata K, Nakayama H, Wei F-Y, Fujimura A, Tazawa H, Asai A, Ogo N, Miyachi H, Nishiki T, Tomizawa K, Takei K, Matsui H
Fluvoxamine, an anti-depressant, inhibits human glioblastoma invasion by disrupting actin polymerization.
Sci Rep. 査読有 6:23372 (2016)
DOI:10.1038/srep23372

Yamada H, Kobayashi K, Zhang Y, Takeda T, Takei K.
Expression of a dynamin 2 mutant associated with Charcot-Marie-Tooth disease leads to aberrant actin dynamics and lamellipodia formation.
Neuroscience letters 査読有 628 : 179-185 (2016)
DOI:10.1016/j.neulet.2016.06.030

Zhang Y, Nolan M, Yamada H, Watanabe M, Nasu Y, Takei K, Takeda T.
Dynamin2 GTPase contributes to invadopodia formation in invasive bladder cancer cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications 査読有 480:409-414 (2016)
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.10.063

Yamada H, Takeda T, Michiue H, Abe T, Takei K
Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells.
International journal of oncology 査読有 49(3):877-886 (2016)
DOI: 10.3892/ijo.2016.3592

[学会発表](計 11 件)

The Mon La, Wakita N, Sumida K, Takeda T, Abe T, Takei K, Yamada H
Role of amphiphysin 1 in actin regulation of glomerular podocyte
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年

隅田健斗, The Mon La, 和木田夏輝, 森田将之, 高島英造, 竹田哲也, 阿部匡史,
竹居孝二, 山田浩司
ダイナミン 2 のシャルコー・マリー・トゥース病の原因変異とアクチン再構成との相関
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年

山田浩司, 阿部匡史, 竹田哲也, 高島英造, 森田将之, 竹居孝二
メカノエンザイム・ダイナミン GTPase によるアクチン線維束化機構の解析
第 70 回日本生物工学会大会 2018 年

Takei K, Wakita N, The Mon La, Sumida K, Moin Saleem, Takeda T, Yamada H
Dynamin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth disease disturbs reorganization of actin cytoskeleton in glomerular podocyte
第 70 回日本細胞生物学会第 5 1 回日本発生生物学会合同大会 2018 年

阿部匡史, 山田浩司, 竹田哲也, 内橋貴之, 安藤敏夫, 竹居孝二
ダイナミン-コルタクチンらせん状複合体の解析:機械的なアクチン線維束形成とアクチン脱重合保護作用
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年

Takeda T, Kozai T, Yang H, Seyama K, Kumagai Y, Abe T, Yamada H, Uchihashi T, Ando T, Takei K
“Clusterase” model of dynamin-mediated membrane fission.
The 2017 ASCB / EMBO Meeting 2017 年

和木田夏輝, The Mon La, 隅田健斗, 竹田哲也, 阿部匡史, 竹居孝二, 山田浩司
ダイナミン 2 のシャルコー・マリー・トゥース病の原因変異は腎ポドサイトのアクチン再構成を阻害する
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年

The Mon La, Wakita N, Sumida K, Takeda T, Abe T, Takei K, Yamada H

アンフィファイジン1の腎系球体ポドサイトにおける役割
2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年

竹田哲也, 小財稔矢, 楊恵然, 石黒大輝, 背山佳穂, 熊谷祐介, 阿部匡史, 山田浩司,
内橋貴之, 安藤敏夫, 竹居孝二
ダイナミンによる膜切断過程の動態イメージング
2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年

石黒大輝, 竹田哲也, 小財稔矢, 熊谷祐介, 背山佳穂, 楊 恵然, 山田浩司, 内橋貴之,
安藤敏夫, 竹居孝二
高速AFMによるダイナミン1-アンフィファイジン複合体の動態観察
第54回日本生物物理学会年会 2016年

山田浩司, 小林絹枝, 張 羽白, 竹田哲也, 竹居孝二
シャルコマリートウス病の原因遺伝子の一つであるダイナミン2の変異は細胞の異常な
アクチン動態とラメリポディア形成の減少をもたらす
第54回日本生物物理学会年会 2016年

〔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:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名: 道上 宏之
ローマ字氏名: Michiue Hiroyuki
所属研究機関名: 岡山大学
部局名: 中性子医療研究センター
職名: 准教授
研究者番号(8桁): 20572499

研究分担者氏名: 竹居 孝二
ローマ字氏名: Takei Kohji
所属研究機関名: 岡山大学
部局名: 医歯薬学総合研究科
職名: 教授
研究者番号(8桁): 40322226

研究分担者氏名: 山田 浩司
ローマ字氏名: Yamada Hiroshi

所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：80325092

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。