様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成　24 年　6 月　11 日現在

機関番号：15101
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011
課題番号：21591839
研究課題名（和文）　膠芽腫における EP4 受容体阻害剤の腫瘍抑制効果の検討

研究課題名（英文）The Investigation of tumor suppression effect of EP4 receptor inhibitors in glioblastoma.

研究代表者
渡辺　高志（WATANABE TAKASHI）
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：00175100

研究成果の概要（和文）：我々はヒト膠芽腫細胞における PGE2 受容体である EP4 の選択的阻害剤の腫瘍抑制効果を検討した。悪性神経膠腫における EP4 受容体の発現は、免疫組織染色法や Western blot 法において良性神経膠腫と比べて亢進していた。選択的 EP4 受容体阻害剤である ONO-AE3-208 と ONO-AE1-328 は、高濃度（50~100uM）で腫瘍増殖抑制や浸潤抑制、アポトーシス誘導効果を示した。以上より *In vivo* での研究を行うためにはさらなる実験の設定を検討する必要が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the tumor suppression effects of selective inhibitors of Prostaglandin E2 receptor, EP4 in human glioblastoma cells. The EP4 expression in malignat gliomas were higher relative to the lower grade gliomas on Immunohistochemistry staining and Western blotting analysis. The selective EP4 receptor inhibitors ONO-AE3-208 and ONO-AE1-328 exhibited the effects of tumor proliferation suppression, tumor invasion suppression and apoptosis induction at high-dose concentrations(50-100uM). They indicated the necessity of further conditional investigations to perform *in vivo* experiments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：膠芽腫、プロスタグランジン E2 受容体 EP4、EGFR

１．研究開始当初の背景

(1)　膠芽腫は成人の大脳半球に好発する神経外胚葉腫瘍で、原発性脳腫瘍の 9%を占める。膠芽腫は脳内を浸潤破壊性に増大し、また増殖能が強いため臨床経過が短く予後が極めて不良である。現在の治療方針としては、手術で可能な限り腫瘍を摘出後に放射線療法と化学療法を追加するのが標準的である。経口アルキル化剤であるテモゾロミドが 2006 年 7 月より本邦で承認されて以降、テモゾロミドと放射線療法の併用が一般的になっているが、膠芽腫患者の生存期間中央値は 15 ヶ月程度であり長期的な予後改善には結びついていない。膠芽腫の発生や増殖、浸潤などは様々な遺伝子異常が誘因となっている事が最近の研究でほぼ明らかになっている。近年では腫瘍の増殖や浸潤、血管新生などに関与する遺伝子異常を標的とした分子標的治療薬が注目されている。分子標的治

療薬は癌の原因により近い分子を標的とするため、癌の個性に基づくより副作用の少ない治療効果が期待されている。

(2)　プロスタグランジン E2 はアラキドン酸より律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)を介して生成される生理活性物質であり、4 種類のプロスタグランジン E2 受容体(EP1-4)を介して様々な生理的作用を発揮することが知られている。COX のアイソザイムの一つである COX-2 は腫瘍細胞や炎症細胞において各種サイトカインより誘導され、その結果プロスタグランジン E2 は過形成される。プロスタグランジン E2 は腫瘍血管新生や細胞増殖、抗腫瘍免疫の抑制などの作用を有しており、これらの作用は主に EP2 と EP4 受容体を介して発揮され、最終的に癌を進行させる。COX-2 阻害剤はアラキドン酸代謝阻害剤として分子標的治療薬の一つとして分類されており、大腸癌や肺癌、乳癌などにおいて腫瘍抑制効果がみられる事が以前より報告されてきた。近年の研究により、プロスタグランジン E2 受容体のうち EP2 と EP4 が主に腫瘍増殖機序に関与している事が解明されてきている。EP2 あるいは EP4 受容体阻害剤やノックアウトマウスにて大腸癌や乳癌の増殖が抑制されることが報告されている。これら受容体を選択的に阻害することにより、より効果的に腫瘍の進行を抑制する可能性を秘めているものと思われる。

２．研究の目的

(1)　最近我々は、COX-2 inhibitor である Troglitazone や Sulindac Sulfide がヒト膠芽腫細胞株の増殖能を抑制し、その抑制効果は細胞株内の EP4 の発現低下が関与している事を初めて証明した。ヒト膠芽腫細胞株の EP4 蛋白発現は良性神経細胞株に比べて亢進しており、COX-2 inhibitor の投与によりヒト膠芽腫細胞株の EP4 蛋白発現は低下した。また EP4 受容体阻害剤や EP4 siRNA の細胞内導入により、膠芽腫細胞の増殖抑制効果がみられる事が解明された。以上より膠芽腫細胞株におけるプロスタグランジン E2 による腫瘍増殖能は EP4 が深く関与しており、COX-2 inhibitor は EP4 の発現を低下させる事により腫瘍抑制に働く事が推察される。

(2)　膠芽腫は多くの細胞において癌抑制遺伝子である PTEN が欠落しており、その結果 PTEN により本来抑制されている PI3-kinase/Akt pathway が細胞膜上における EGFR を介して活性化され腫瘍増殖を促進することが解明されている。プロスタグランジン E2 は EP4 より EGFR を介して PI3-kinase/Akt pathway を活性化するとの報告がみられ、今回のヒト膠芽腫細胞株における EP4 受容体と腫瘍増殖能との関連性の一因と思われる。

(3)　今回の研究において、我々は EP4,EGFR,PI3-kinase/Akt pathway との関連をヒト膠芽腫細胞株や膠芽腫患者より手術にて摘出した組織を使用して詳細に検討し、EP4 発現低下による膠芽腫増殖抑制のメカニズムを解明する予定である。これらの研究結果より、EP4 受容体阻害剤投与が今後新たな視点での膠芽腫の治療法として結びつく可能性があると思われる。

３．研究の方法

(1)　手術により摘出した膠芽腫および良性神経膠腫の組織と正常脳組織を用いて、EP4 の蛋白発現が悪性度に比例して亢進しているか免疫組織染色法や Western blot 法で確認する。また同様に、EP4 による腫瘍増殖に関与していると思われる EPFR や Akt などの因子も悪性度に比例して発現が亢進しているか確認する。

(2)　小野薬品工業より選択的 EP4 受容体阻害剤である ONO-AE3-208 と ONO-AE1-328 を提供してもらい、ヒト膠芽腫細胞における選択的 EP4 受容体阻害剤の腫瘍増殖抑制効果を MTT assay で検討する。また同様に、ヒト膠芽腫細胞における EP4 受容体阻害剤の腫瘍浸潤能抑制効果とアポトーシス誘導効果について Invasion assay や Caspase-3/7 assay などで検討する。

(3)　プロスタグランジン E2 は EP4 より EPFR を介して PI3-kinase/Akt pathway を活性化するとの報告がみられており、選択的 EP4 受容体阻害剤である ONO-AE3-208 と ONO-AE1-328 をヒト膠芽腫細胞に投与して、EGFR や Akt などの発現の変化を Western blot 法などを使用して調査する。

(4)　ヌードマウスにヒト膠芽腫細胞株(U87MG)を皮下に移植し、Xenograft model を作成する。その後 Xenograft model に EP4 受容体阻害剤を経口もしくは経腹膜的に投与して腫瘍増殖能の抑制効果を調査する。さらに移植した腫瘍を摘出して、EGFR や Akt の発現変化を免疫組織染色法や Western blot 法などで検討する。さらに U87MG を免疫抑制マウスの頭蓋内に移植して intracranial xengoraft model を作成する。このモデルに EP4 受容体阻害剤を経静脈あるいは経脳室的に投与する。その後に脳を摘出し、脳内での膠芽腫の浸潤の変化を HE 染色などで確認する。また同時に免疫組織染色法や Western

blot 法などで EGFR や Akt の発現を調査する。

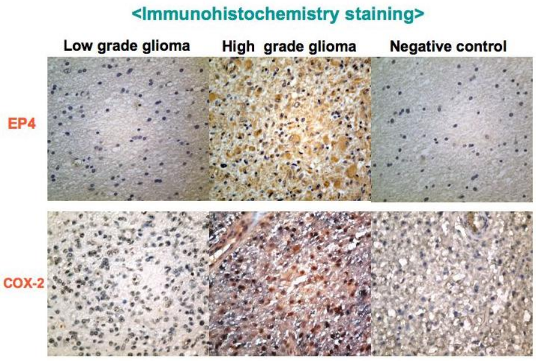
４．研究成果

(1) 手術により摘出した悪性神経膠腫(grade IIIーIV)および良性神経膠腫（grade Iー II）のパラフィン封埋切片よりプレパラートを作製して、免疫組織染色法にて EP4 の発現を検討した(table 1)。良性神経膠腫に比べて悪性神経膠腫の EP4 発現は亢進しており、悪性度に比例することが判った。また EP4 による腫瘍増殖に関与していると予測される EGFR、Akt やプロスタグランジン E2 産生に関与する律速酵素である COX-2 や mPGES-1 などの遺伝子発現も同様に検討したが、悪性度に比例して発現が亢進していた。正常脳組織でもこれら遺伝子の発現を免疫組織染色法で検討したが、ほとんど発現はみられなかった(Fig.1)。ヒト膠芽腫細胞である T98G と U87MG を使用して、EP4、EGFR,Akt などの遺伝子発現を Western blot 法や RT-PCR 法で蛋白、および RNA レベルで検討した。両細胞においてこれら遺伝子の発現は強発現しており、免疫組織染色の結果と同様であった。

年齢	性別	組織	WHO grade
37	M	OD	II
75	M	Ependymoma	II
46	M	OD	II
21	M	Ganglioglioma	I
21	F	Pilocytic astrocytoma	I
35	M	diffuse astrocytoma	II
38	M	OD	II
45	F	OD	II
18	M	diffuse astrocytoma	II
12	F	Ganglioglioma	I
34	F	Pilocytic astrocytoma	I
56	M	GBM	IV
53	F	GBM	IV
59	F	AA	III
56	M	AA	III
66	M	GBM	IV
62	F	GBM	IV
58	F	GBM	IV
71	M	GBM	IV
31	F	AA	III
71	F	AA	III
65	M	GC	III

Table 1

OD:oligodendroglioma
GBM:glioblastoma
AA:anaplastic astrocyotma
GC:gliomatosis cerebri



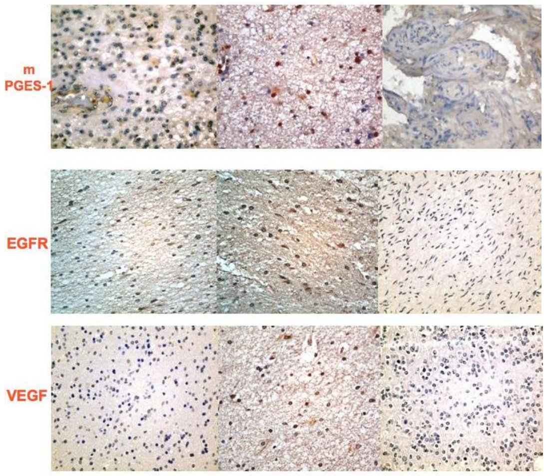


Figure 1

(2) 小野薬品工業より選択的 EP4 受容体阻害剤である ONO-AE3-208 と ONO-AE1-328 と提供してもらい、ヒト膠芽腫細胞(U87MG, T98G)に投与して細胞増殖抑制効果を MTT assay で検討した。比較のために代表的な COX-2 阻害剤であるセレコキシブも同様に投与した。96-well plate に 1 ×10 (3) 個/well の細胞を撒いて 70% confluence になるまで 10% FBS 含有標準培養液で成長させた。その後薬剤を投与し、無血清培養液下で day1-3 まで増殖能を調べた。細胞は 10%FBS 含有下でも 96-well plate 内では増殖が悪いため、薬剤投与時にアラキドン酸で細胞刺激を行った。アラキドン酸で刺激すると、細胞増殖能は改善した。しかしながら、選択的 EP4 受容体阻害剤 2 剤とも 50～100μM 投与下では Day3 において細胞増殖抑制を認めるも、10～25μM 投与下では抑制効果はみられなかった(Fig.2-3)。セレコキシブでは同じ条件で 10μM 投与下で有意に抑制されており、以前 EP4 受容体阻害剤(AH23848)を使用して soft agar assay で行った実験結果と相反する結果となった。この結果は高濃度の選択的 EP4 受容体阻害剤を投与しないと、腫瘍増殖抑制効果が得られないことを示唆していた。

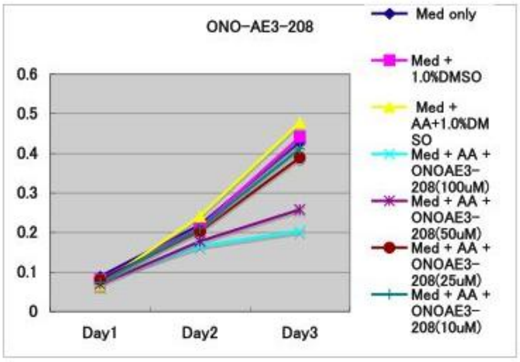


Figure 2

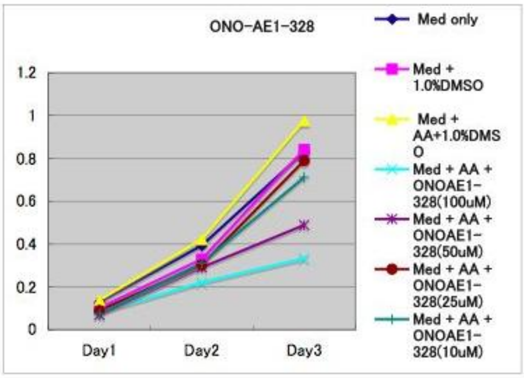


Figure 3

(3)　上記結果より in vivo での実験でも高濃度の EP4 受容体阻害剤をマウスに投与する必要があり、毒性を加味する必然性が出てきた。そのため、in vivo の実験は再考する必要があったため、まず in vitro における EP4 受容体阻害剤の腫瘍浸潤能抑制効果とアポトーシス誘導効果について検討した。MTT assay と同様に 96-well plate に 1 ×10 (3) 個/well の両細胞を撒いて 70% confluence になるまで 10%FBS 含有標準培養液で成長させた。その後薬剤を投与し、無血清培養液下で 72 時間後に浸潤能と 24 時間後にアポトーシス誘導効果を調べた。また細胞は薬剤投与時にアラキドン酸で細胞刺激を行った。まず Cell Invasion & Detection Assay Kit (Platypus Technologies)を使用して浸潤能抑制効果を検討したところ、両薬剤ともに 50μM 投与下にて抑制効果が得られた。アポトーシス誘導効果に関しては、In situ apoptosis detection kit (Takara Bio.)と Caspase-3/7 Assay (Promega)を使用した。両薬剤とも 50μM 投与下において、apoptosis index の上昇と caspase-3/7 活性化を認めた。以上より選択的 EP4 受容体阻害剤はヒト膠芽腫細胞において、比較的高濃度投与下において腫瘍浸潤能抑制効果とアポトーシス誘導効果が得られる事が分かった。

(4)　上記結果内容より、選択的 EP4 受容体阻害剤によるヒト膠芽腫細胞の腫瘍増殖、浸潤、アポトーシス誘導効果を得るには比較的高濃度(50〜100uM)の投与が必要であることが判明した。動物モデルを使用した in vivo 実験を行うには、現在の条件では生体への毒性を考慮する必要がある。以上より in vivo 研究を進めるためには、新たな設定条件を考慮するか adjuvant chemical の必要性があると思われる。

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）

〔学会発表〕(計　2　件)

① 神部敦司 The COX inhibitor, sulindac sulfide inhibits EP4 expression and suppresses the growth of Glioblastoma cells. 12th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer. 2011 年 9 月 19 日 Seattle, USA.

② 神部敦司 The cyclooxygenase inhibitors inhibit EP4 expression and suppresses the growth of glioblastoma cells. Joint Neurosurgical Convention 2010. 2010 年 1 月 25 日　Hawaii, USA.

６．研究組織
(1)研究代表者
　渡辺　高志 (WATANABE TAKASHI)
　鳥取大学・医学部・教授
　研究者番号：00175100

(2)研究分担者
　神部　敦司 (KAMBE ATSUSHI)
　鳥取大学・医学部・助教
　研究者番号：70348283