

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 7 月 29 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501362

研究課題名(和文) 悪性グリオーマ由来がん性幹細胞を標的とした新規低分子化合物の開発

研究課題名(英文) Development of a novel small-molecule compounds targeting cancer stem cells derived from malignant glioma

研究代表者

芦澤 忠 (Ashizawa, Tadashi)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：10443441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性の脳腫瘍(グリオーマ)は治療効果や予後が悪く、平均生存期間は1年程しかありません。故に、グリオーマに対する新しい薬剤の開発が望まれております。近年、がんの元になるがん幹細胞の存在が明らかとなっております。我々は、脳腫瘍組織から単離・培養して樹立したがん幹細胞を死滅させる能力を持つ化合物を探索することが新規な抗がん剤の開発に繋がると考え、静岡県環境衛生科学研究所の化合物ライブラリーよりがん幹細胞に対して効果のある化合物を探索した結果、5つの有望化合物を見出した。今後は、開発化合物やその周辺化合物の薬効評価、安全性試験及び知的財産権の確保とともに、新しい治療薬としての可能性を追求したい。

研究成果の概要(英文)：Despite of an intensive therapy, the prognosis of malignant gliomas is still poor, and average overall survival is only about a year. Therefore, the development of new drugs against gliomas has been required. In recent years, the novel therapeutic regimens against cancer stem cells have been investigated. In the current study, We established a small-molecule compound library screening system consisting of in silico study and in vitro proliferation assay using glioma patients-derived stem cell lines in a collaboration with Shizuoka Institute of Environment and Hygiene. So far we found that five promising compounds which have potent inhibitory activity on stem cell proliferation, and even a few compounds showed anti-stem cell tumor activity in vivo. In the future, through preclinical safety and drug delivery study of identified compounds, we are planning to pursue the possibility of a new therapeutic agent against glioma stem cell.

研究分野：分子標的治療

キーワード：がん幹細胞治療薬

1. 研究開始当初の背景

1) 悪性グリオーマ (WHO Grade3 以上) は、未だに極めて難治性で予後の悪い腫瘍であり、手術後の集学的治療 (放射線照射 + 化学療法) にもかかわらず平均生存期間は 12 か月と近年予後の改善はほとんど認められていない。新規のアルキル化剤である Temozolomide (以下 TMZ) の出現以来、やや生存期間の延長が報告されてはいるが (Stupp R et al. N Engl J Med 352: 987, 2005; Mirimanoff RO et al. J Clin Oncol 24: 2563, 2006)、十分ではなく、TMZ に耐性となった症例では現在有効な治療法は確立されていない。

2) 一方でグリオーマ細胞に関する研究は、マルチオミクス的な解析技術の大きな進歩により、活発に行われており、特にがん性幹細胞については、多くの新しい知見が報告されている (Suva ML. Cell 157: 1, 2014; Meyer M et al. Proc Natl Acad Sci USA 112: 851, 2015)。しかし、がん性幹細胞を標的とした特異的な治療薬の開発はまだなされていない。また創薬研究のソースである化合物ライブラリーは貴重な研究資源であり、スクリーニング作業にも多大なマンパワーを必要とする。この貴重な研究資源を有効活用し、研究の効率化を図る手法として、*in silico*での化合物スクリーニング法、すなわち、化合物の吸収 (**A**bsorption)、分布 (**D**istribution)、代謝 (**M**etabolism)、排泄 (**E**xcretion) および毒性 (**T**oxicity) (**ADMET**) を考慮した化合物の物性に基づいた予測プログラムが創薬研究に応用されている。

2. 研究の目的

静岡がんセンター研究所にて患者腫瘍組織より樹立したグリオーマがん性幹細胞培養株を標的として、抗細胞活性をもつ低分子化合物をライブラリーよ

り選別し、がん性幹細胞に特異的に増殖抑制活性をもつリード化合物を同定することを目的とする。化合物の選別に当たっては、物性を評価しうる *in silico* ADMET 予測プログラムによるスクリーニングと *in vitro* の抗細胞活性を評価する増殖アッセイを組み合わせを行い、得られたリード化合物は優先して *in vivo* での抗腫瘍活性の評価に回す。3年間で有意な抗腫瘍活性をもつ複数のリード化合物を同定し、企業とのアライアンスを目指す。

3. 研究の方法

1) 化合物ライブラリー (静岡県環境衛生研究所にて保有、約 10 万の化合物を網羅) より ADMET 予測プログラムによる *in silico* スクリーニングにより、がん性幹細胞を用いた *in vitro* 試験用の候補化合物を選択して研究の効率化を図った。

2) *In vitro* 試験の細胞として、静岡がんセンター研究所にておいて、樹立したグリオブラストーマ症例由来がん性幹細胞の培養株の中で最も増殖の速い GB-SCC010T を使用した。抗細胞活性の評価には、WST-1 アッセイおよび Sphere formation assay にて抗細胞活性の評価を行い、IC50 値 (50%細胞上抑制濃度) を化合物選別の指標とする (Ashizawa T et al. Int J Oncol 38: 1245, 2011)。

①グリオーマがん性幹細胞に対する IC50 値 1 μ M 以下

②グリオーマ親株よりも 10 倍以上強い抗細胞活性 (IC50 値の比較)

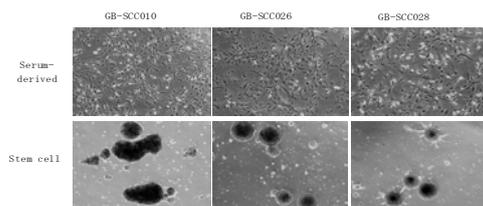
3) *In vivo*での薬効評価試験については、ADMET予測プログラムによる *in silico* スクリーニングとがん性幹細胞に対する *in vitro* 抗細胞試験において選択されたリード候補化合物の大量合成をあらかじめ行った。グリオブラストーマ症例由来がん性

幹細胞培養株GB-SCC010Tやテモゾロミド耐性ヒトグリオーマ神経膠芽腫U87細胞(U87TMZR)をマウスの皮下に移植した。腫瘍移植後、腫瘍体積が50~300mm³に達した時期に0.5%メチルセルロースで調製した被験化合物を担癌マウスの腹腔内に投与した。抗腫瘍効果の判定として、腫瘍体積は下記の式にて算出し、一般症状や全身毒性の目安である体重測定も行った(Ashizawa T et al. Int J Oncol 43: 219, 2013)。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times [\text{短径 (mm)}]^2 \times 1/2$$

4. 研究成果

1) 静岡がんセンター研究所にて樹立した3種のグリオブラストーマ症例由来がん性幹細胞の培養株(GB-SCC010T、GB-SCC026T、G-SCC028T)について(下図)、19種の幹細胞関連マーカーの発現等をReal time-PCR法により測定した。3株とも5種の幹細胞マーカー(CD133、MDR1、Olig2、Sox2、VEGFA)が共通に増幅していることを確認した(下表)。

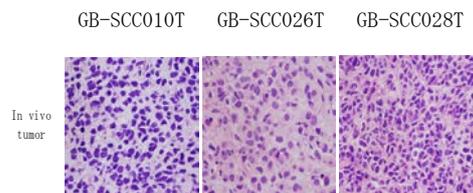


Frequency of stem cell-associated markers in GB-SC lines

Gene	GB-010	GB-026	GB-028
ALDH1A1	N.D.	0.01	5.59
CD133	14.1	27985	3831
CD44	4.68	0.84	45.3
c-Myc	1.92	5.59	0.23
EGFR	48.7	0.17	25.3
ESA	11.7	0.51	49.8
GFAP	4.04	86.5	420
KLF4	27.4	1.21	4.88
MDR1	197220	18.8	783
NANOG	88.3	2.53	448
Nestin	44.7	2.65	398
Oct4/5	69.6	4.87	41.3
OLIG2	124	2035	56420
SOX2	74.3	4635	693
TGFBR2	0.03	0.02	0.06
TUBB3	20.1	17.9	139
VEGFA	77.2	89.1	329
VEGFR2	0.58	0.03	5.76
Vimentin	47.1	3.83	16.8

The quantitative PCR for GBM-stem cell markers performed using TaqMan probes and specific primers. The expression level in serum-derived cells was rated 1 as a control, and gene expression in stem cell lines was shown as fold increase to a control. N.D.: not detected.

2) グリオブラストーマ症例由来がん性幹細胞培養株(GB-SCC010T、GB-SCC026T、G-SCC028T)について、超免疫不全マウス(NOGマウス)への皮下移植における造腫瘍性を確認した。その結果、移植した3株すべてにおいて造腫瘍性が確認された。また、3株の腫瘍を摘出して病理組織学的に検索したところ、外科的に切除された腫瘍の組織像と同一の所見であった(下図)。



3) 静岡県環境衛生科学研究所の約10万の化合物ライブラリーから選択された6600化合物について、TMZ治療再発症例由来のグリオブラストーマがん性幹細胞培養株GB-SCC010T株を用いた*in vitro*抗細胞活性試験において、化学構造が異なる5化合物(化合物A、化合物B、化合物C、化合物D、化合物E)が脳腫瘍幹細胞に対して高い感受性を示した。それぞれの化合物の抗細胞活性は、対照化合物WP1066(現在、phase1試験中)よりも強かった(下表)。

化合物	抗細胞活性
化合物A	+
化合物B	+++
化合物C	+++
化合物D	++
化合物E	++
WP1066	±
テモゾロミド(TMZ)	-

判定基準(IC50): >100μM(-)、>5μM(±)、<5μM(+)、<1μM(++), <0.5μM(+++)

4) 2化合物(化合物A及び化合物B)について優先的に*in vivo*抗腫瘍試験を実施した結果、WP1066が無効のグリオブラストーマ症例由来がん性幹細胞培養株GB-SCC010Tやテモゾロミド耐性グリオー

マU87細胞 (U87TMZR) に対して、2つの化合物は有効判定基準値に近い活性を示した。特に、グリオブラストーマ幹細胞は抗がん剤に耐性を示す特性を持っているが (Bayin NS et al. World J Stem Cells 6: 230, 2014)、化合物Bはテモゾロミド耐性ヒトグリオーマ細胞移植モデル (U87TMZR) に対しても明らかな腫瘍の増殖抑制活性を示した (下表)。

化合物	抗腫瘍活性	
	GB-SCC010T	U87TMZR
化合物A	+	NT
化合物B	NT	++
WP1066	NT	-
TMZ	-	-

判定基準(T/C%): >75%(-), ≥50%(+), <50%(++)

以上より、化合物A及び化合物Bあるいはその周辺化合物や他の化合物については、それぞれの化合物の作用機序解析、薬物動態及び詳細な抗腫瘍活性等の評価を継続することは極めて重要である。最終的には、グリオブラストーマ幹細胞に対して優れた抗腫瘍性を有する新規化合物の非臨床試験 (安全性試験) のための最終候補化合物を選択するとともに、知的財産権の確保 (新規特許の出願) を行う予定である。さらに、製薬企業とのアライアンスを構築したいと考えている。

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5件)

- ① Akiyama Y, Oshita C, Kume A, Iizuka A, Miyata H, Komiyama M, Ashizawa T. α -type-1 polarized dendritic cell-based vaccination in recurrent high-grade glioma: a phase I clinical trial. BMC Cancer. 27;12:623, 2012. doi: 10.1186/1471-2407-12-623.

- ② Ashizawa T, Komiyama M, Mitsuya K, Matsuno K, Nakasu Y, Yamaguchi K, Akiyama Y. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. Int J Oncol. 43:219-27, 2013. doi: 10.3892/ijo.2013.1916.

- ③ Akiyama Y, Komiyama M, Miyata H, Yagoto M, Ashizawa T. Novel cancer-testis antigen expression on glioma cell lines derived from high-grade glioma patients. Oncol Rep. ;31:1683-90, 2014. doi: 10.3892/or.2014.3049.

- ④ Ashizawa T, Akiyama Y. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of a temozolomide-resistant glioblastoma cell line. Int J Oncol. 45:411-8, 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2439.

- ⑤ Akiyama Y, Ashizawa T, Komiyama M. YKL-40 downregulation is a key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. Oncol Rep. 32:159-66, 2014 doi: 10.3892/or.2014.3195.

[学会発表] (計3件)

- ① 小宮山 優: 悪性グリオーマ患者より樹立したグリオーマ初代培養細胞株での腫瘍抗原の発現. 第71回日本癌学会学術総会, 横浜, 2012.9.9
- ② 芦澤 忠: 神経膠芽腫患者由来のがん性幹細胞の増殖に及ぼすSTAT3阻害剤STX-0119の効果. 第72回日本癌学会学術総会. 横浜. 2013.10.4
- ③ 芦澤 忠: テモゾロミド耐性神経膠芽腫細胞に対するSTAT3阻害剤STX-0119のin vitro及びin vivo抗腫瘍効果. 第73回日本癌学会学術総会. 横浜. 2014.9.25

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦澤 忠 (ASHIZAWA TADASHI)
静岡県立静岡がんセンター研究所
研究者番号: 10443441

(2) 研究分担者

秋山 靖人 (AKIYAMA YASUTO)
静岡県立静岡がんセンター研究所
研究者番号： 70222552

(3) 研究分担者

安藤 隆幸 (ANDO TAKAYUKI)
静岡県環境衛生科学研究所
研究者番号： 40402226