

平成30年6月21日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18968

研究課題名(和文) 神経膠芽腫細胞におけるテモゾロミドおよびバルプロ酸の浸潤・遊走阻害効果の解明

研究課題名(英文) Combination effects of temozolomide and valproic acid on cell invasion and migration in glioblastoma cell lines

研究代表者

藤田 恵 (FUJITA, MEGUMI)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：50509966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫は最も予後の悪い脳腫瘍である。正常脳組織への浸潤が強いため、浸潤や遊走を阻害する薬物療法の開発が早急に望まれる。そこで神経膠芽腫患者で常用される抗がん剤テモゾロミドおよび抗てんかん薬バルプロ酸を用いて、両薬物が浸潤および遊走に及ぼす影響を4種の神経膠芽腫細胞で検討した。

両薬物の併用では神経膠芽腫の細胞種により浸潤、遊走を阻害する場合と増長する場合があることを明らかにした。その要因は本検討では十分には明らかにされなかったが、integrinおよび下流シグナルが何らかの影響を及ぼす可能性が示された。今後、検討を重ねることで、適正な薬物使用法の提案につながる知見を提供できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma multiform (GBM) is most malignant in all central nervous system tumors. As invasiveness is one of the malignant characteristics of GBM, it is important to develop a novel treatment strategy. We then investigated the effects of temozolomide (TMZ) and valproic acid (VPA), which are frequently used in GBM patients as a anticancer drug and a antiepileptic drug, respectively, on cell invasion and migration in four GBM cell lines. TMZ and VPA decreased cell invasion in T98G cells, but they tended to increase invasion and significantly increased migration in U118MG cells. The integrin cascade could be involved in these effects. However, the mechanisms was not clearly elucidated and further investigation is needed.

研究分野：薬学(癌)

キーワード：がん 神経膠芽腫 テモゾロミド バルプロ酸 併用効果 浸潤 遊走

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経膠芽腫 (Glioblastoma) は、原発性脳腫瘍の約 10% を占める腫瘍である。脳腫瘍の中でも最も悪性度が高い Grade に分類され、1 年および 3 年生存率がそれぞれ 55 および 12%、生存期間中央値はわずか 14.1 ヶ月と非常に予後が悪く、早急に新規治療法の開発が強く望まれる。神経膠芽腫では、手術による腫瘍の摘出に続き、抗がん剤と放射線を用いた術後補助療法を行うのが標準的であり、現在、抗がん剤の第一選択薬はテモゾロミドである。また、神経膠芽腫患者では、腫瘍摘出の開頭手術後におこる症候性てんかんの予防や治療のために、バルプロ酸などの抗てんかん薬を併用する 경우가多く、テモゾロミドおよびバルプロ酸は、神経膠芽腫患者において最もよく使用される薬といえる。

(2) このような背景から、神経膠芽腫における新たな治療法および治療ターゲットの探索を目的として、複数の神経膠芽腫細胞を用いて、テモゾロミドと抗てんかん薬のがん細胞増殖抑制効果を行ってきた。その結果、種々の抗てんかん薬のうちバルプロ酸のみがテモゾロミドと相乗効果を示すことを明らかにした。

(3) 一方、神経膠芽腫は、周囲の脳への浸潤傾向が非常に強い性質があり、正常脳組織との境界線も明瞭でないため、手術で腫瘍を完全に摘出することは難しい。さらに抗がん剤の効果も限局的であるため、残存したがん細胞が再増殖し、多くの患者が 1 年以内に再発する。したがって、浸潤・遊走予防効果をもつ薬物を見つけることは、再発の予防すなわち予後の改善において重要な課題であるといえる。しかしながら、テモゾロミドおよびバルプロ酸は、神経膠芽腫細胞の浸潤・転移予防効果についての報告が非常に少なく、またその併用効果は明らかとなっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本課題では、テモゾロミドおよびバルプロ酸の浸潤・遊走阻害効果を解明することを目的とした。具体的には以下の 4 点を明らかとする予定とした。

- (1) 4 種の神経膠芽腫細胞の浸潤・遊走能
- (2) テモゾロミド・バルプロ酸単独処置時の浸潤・遊走阻害効果
- (3) テモゾロミド・バルプロ酸併用処置時の浸潤・遊走阻害効果
- (4) 浸潤・遊走関連因子のタンパク発現レベルに及ぼす影響

3. 研究の方法

(1) 4 種の神経膠芽腫細胞の浸潤・遊走能の検討。

本研究では、神経膠芽腫細胞株として常用される T98G、U87MG、U118MG および A172

細胞の 4 種類を用いた。浸潤実験には、浸潤特性を *in vitro* で評価できる BD BioCoat マトリゲルインベーションチャンバー® (BD Biosciences 社) を用いた。まず、マトリゲルでコーティングされた 8 μm ポアサイズのメンブレンのついたインサート (上層) に細胞を播種し、浸潤・遊走誘引因子として 10% 牛胎仔血清 (FBS) を下層に入れて 24 時間インキュベートした。メンブレン下層に移動した細胞をメタノールで固定し、ギムザ染色後、メンブレンを封入し、顕微鏡で複数視野での細胞数を測定した。なお、遊走実験では、マトリゲルのコーティングされていないチャンバーを用いて、上記と同様のプロトコルで実施した。

(2) テモゾロミドおよびバルプロ酸単独および併用処置時の浸潤・遊走に及ぼす影響の検討。

まず、浸潤・遊走実験で用いる濃度を決定するための予備検討を行った。FBS 非含有培地で細胞を 96 well plate に播種し、接着が完了した 4 時間後に、種々の濃度の薬物を添加し、24 時間後に CellQuantBlue® (BioAssay System 社) 試薬を用いて蛍光強度を検出し、生存率を算出した。同様に、併用時の濃度も決定し、生存や増殖に影響のない範囲で濃度を設定した。(1) の方法に順次、上層および下層に各薬物を添加し、非添加時と比較して、単独および併用処置時の浸潤および遊走への影響を検討した。

(3) テモゾロミドおよびバルプロ酸が浸潤・遊走関連因子の発現に及ぼす影響の検討。浸潤・遊走関連因子として重要な MMP、Rho や integrin の発現変動をウェスタンブロット法にて検出した。すなわち、(2) と同条件下 (細胞播種密度・薬物処置濃度・処置時間) で細胞を回収・抽出し、SDS-PAGE ゲルでの泳動、PVDF メンブレンへの転写、抗体反応を経て、ECL select® 試薬と ECL カメラを用いて可視化し、発現レベルを確認した。

なお、(2) で相乗効果の傾向が認められた T98G 細胞および拮抗作用を示した U118MG 細胞を選択して実施した。

4. 研究成果

(1) 4 種の神経膠芽腫細胞のうち、A172 および U87MG 細胞は浸潤能が高く、T98G および U118MG 細胞では低かった。また遊走能も同様の結果であった。したがって、同じ神経膠芽腫細胞間でも細胞種により浸潤および遊走能力に差があることが明らかになった。

(2) まず予備検討により、テモゾロミドおよびバルプロ酸の単独および併用時の処置濃度を決定した。続いて、単独および併用処置時の浸潤・遊走阻害効果を検討したところ、A172 および U87MG 細胞では、両薬物の単独および併用処置による浸潤および遊走への影響は認められなかった。しかしながら、

T98G 細胞では、各薬物単独処置では影響はみられなかったものの、併用処置により浸潤細胞の割合が有意に低下した(図1左)。

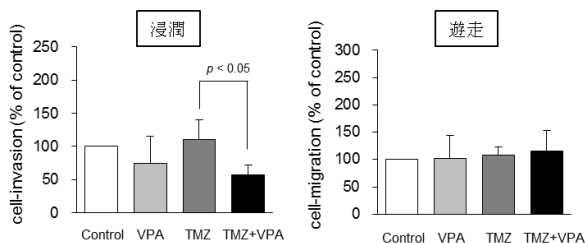


図1. T98G 細胞におけるテモゾロミドおよびバルプロ酸の浸潤および遊走への影響 (VPA: バルプロ酸、TMZ: テモゾロミド)

一方、U118MG 細胞では、テモゾロミド単独およびバルプロ酸との併用処置により、無処置群と比較して、浸潤細胞の割合は増加傾向を示し、遊走細胞の割合は有意に高くなった(図2)。

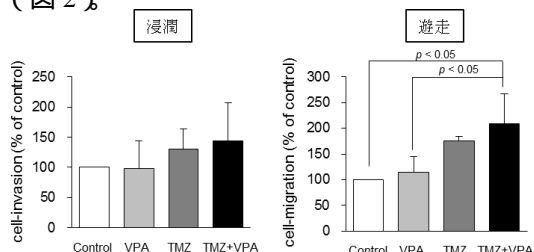


図2. U118MG 細胞におけるテモゾロミドおよびバルプロ酸の浸潤および遊走への影響 (VPA: バルプロ酸、TMZ: テモゾロミド)

したがって、神経膠芽腫の細胞種により、両薬物が浸潤・遊走を抑制する場合と増長する場合があります、影響が異なることが明らかとなった。

(3)

作用機序を解明するために、異なる影響が示された T98G 細胞および U118MG 細胞を選択し、薬物併用処置後の細胞を抽出後、ウェスタンブロット法により浸潤・遊走関連因子の発現変動を検討した。基底膜分解作用を示す MMP-2 および 9、細胞の運動性に関わる Rho および Rac は、いずれの細胞においても顕著な変動が認められなかった。

また基底膜内での遊走や転移に関係する接着因子 integrin (7 種) を検出した結果、T98G 細胞での発現は顕著に変動しなかったが、integrin の下流シグナルである FAK のリン酸化が増加し、シグナルの活性化が認められた(図3上)。一方、U118 細胞では薬物併用処置により integrin 6 が増大傾向を示したものの、5 および下流のリン酸化 FAK の発現が減少し、活性の低下が認められた(図3下)。

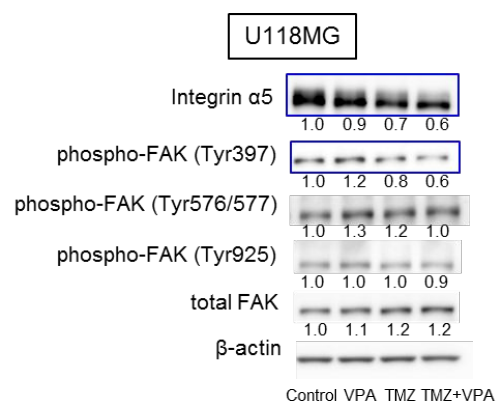


図3. T98G および U118MG 細胞におけるテモゾロミドおよびバルプロ酸併用時の integrin および FAK 活性化への影響 (VPA: バルプロ酸、TMZ: テモゾロミド) (図内の数値は、相対的な発現割合を示す)

両薬物の併用効果について、その要因については、本検討では十分には明らかにされなかったが、integrin および下流シグナルが何らかの影響を及ぼす可能性も示された。

今後、更なる検討を重ねることで、これら既存薬の適正な使用法を提案し、浸潤・遊走抑制作用を含めたより良い薬物療法の開発につながる知見を提供できることが期待される。

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

辻屋 徳恵 藤田 恵 他, 神経膠芽腫細胞におけるテモゾロミドおよびバルプロ酸の併用効果, 医療薬学会 第2回フレッシューズ・カンファランス, 2018年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 恵 (FUJITA, Megumi)
武庫川女子大学・薬学部・助教
研究者番号：50509966

(4)研究協力者

前 沙織 (MAE, Saori)
山口 京子 (YAMAGUCHI, Kyoko)
辻屋 徳恵 (TSUJIYA, Yoshie)