

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15602

研究課題名（和文）膠芽腫の低酸素領域克服に向けた薬剤の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of drugs for overcoming hypoxia in glioblastoma

研究代表者

小池 直義 (Koike, Naoyoshi)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60464913

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膠芽腫の放射線抵抗性は腫瘍内低酸素領域が原因であることに着目し、低酸素領域特異的に集積するニトロイミダゾール化合物に着目した。ドラニダゾールは、膠芽腫の低酸素領域の放射線増感作用に加え、単独で低酸素領域にある腫瘍に対し殺細胞効果があることを明らかにし、その作用機序としてミトコンドリアへの影響を見出した。同種同所移植マウスモデルにおいてドラニダゾールと放射線照射の併用はマウスの生存延長に寄与し、ドラニダゾールが膠芽腫の放射線増感剤として有望な薬剤であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は放射線治療抵抗性であることが多く、膠芽腫を制御するために放射線増感剤が求められている。本研究で膠芽腫に対する有望な放射線増感剤としてドラニダゾールを見出した。低酸素マーカーとして診療で使用されている¹⁸F-FMISOと同じ2-ニトロイミダゾール化合物であり、薬剤集積と効果予測とがたてやすいという利点がある。臨床試験に進む前段階の研究を行うことができた。

研究成果の概要（英文）：The radioresistance of glioblastoma is caused by the hypoxic region in the tumor. The nitroimidazole compounds that accumulates specifically in the hypoxic region were analyzed for overcoming radioresistance. Among nitroimidazole compounds, doranidazole had a radiosensitizing effect in the hypoxic region of glioblastoma and a cell-killing effect by itself. The mechanism of cell death by doranidazole was mitochondrial stress. In the allogeneic orthotopic mouse brain tumor model, the combined use of doranidazole and irradiation contributed to prolongation of mouse survival.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：低酸素 放射線治療 膠芽腫 2-ニトロイミダゾール化合物 theranostics

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は集学的治療にも関わらず根治困難な悪性脳腫瘍であり、2年程度の生存しか望めない。治療後再発の原因の一つとして腫瘍の放射線治療抵抗性があげられ、特に腫瘍が低酸素領域を有することが大きな問題となっている。なぜなら、低酸素領域では放射線照射によるDNA損傷が著しく低下するからである。さらに、低酸素領域は血管から距離が離れており薬剤到達が困難であるため薬剤の効果に乏しいという問題点もある。そこで、本研究では低酸素領域特異的に集積するニトロイミダゾール環をもつ化合物に着目し、放射線増感効果と単剤での低酸素領域特異的な殺細胞効果を評価し、膠芽腫の新たな治療戦略を模索した。

2. 研究の目的

膠芽腫の低酸素領域での放射線増感効果および殺細胞効果を有する薬剤の同定を目的にして、本研究ではマウスの膠芽腫モデルを用いて以下の項目を検討した。

- (1) 低酸素環境下で放射線増感効果と殺細胞効果を有するニトロイミダゾール環を有する薬剤の同定
- (2) 同定された薬剤の低酸素環境下での放射線増感効果の機序と殺細胞効果の機序の同定
- (3) 同定された薬剤の *ex vivo* および *in vivo* での効果確認

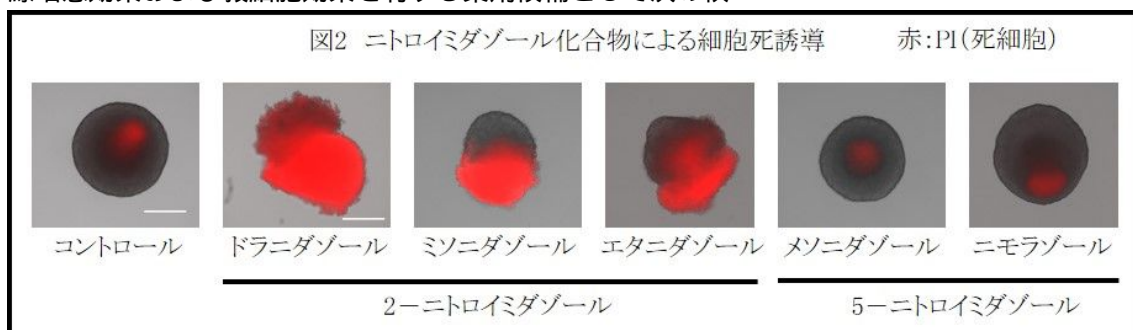
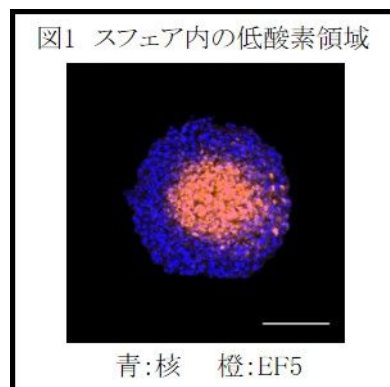
3. 研究の方法

マウスの膠芽腫モデルとして *Ink4/Arf* 欠失マウスの神経幹細胞にがん遺伝子である HRasV12 を過剰発現させた人工マウスグリオーマ細胞 (Glioma stem cells: GSC) を用いて以下の解析を行った。

- (1) 低酸素領域を有する GSC のスフェアにニトロイミダゾール環を有する複数の薬剤を投与し、PI 染色を行い薬剤の殺細胞効果を評価する
- (2) 低酸素環境下での薬剤の放射線増感効果をコロニー形成法と γ -H2AX 染色で評価する。
- (3) 薬剤の殺細胞効果の機序を明らかにするために、薬剤投与後に RNA を抽出しマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。
- (4) 薬剤の作用機序としてミトコンドリアへの影響が示唆されたため、細胞外フラックスアナライザーを用いて効果を検討した。
- (5) 薬剤の効果を GSC のマウスモデルを用いて *ex vivo* および *in vivo* で確認した。

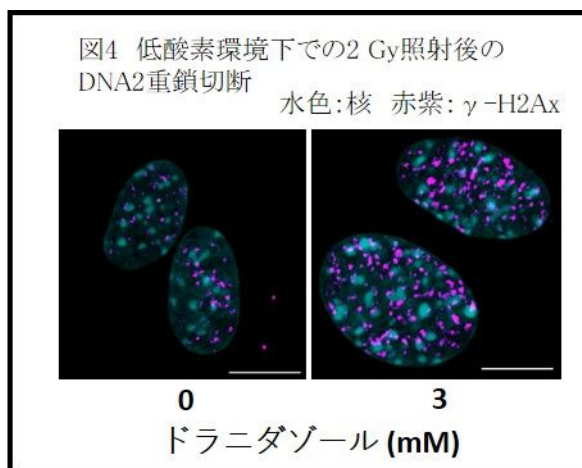
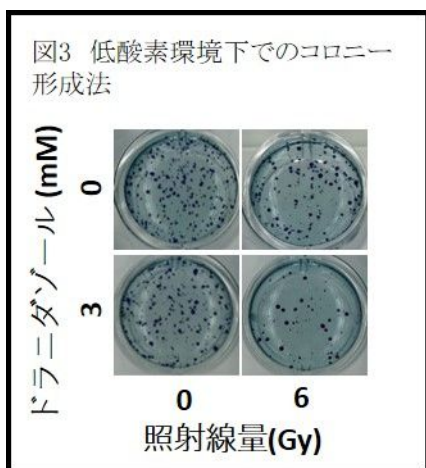
4. 研究成果

(1) GSC のスフェアが低酸素を有しているかを確認するために、低酸素標識マーカーである EF5 で染色を行った。図 1 に示す通りスフェアの内部に EF5 の染色が認められたため、次にこのスフェアにニトロイミダゾール環を有する複数の薬剤を投与し効率的に細胞死を誘導する薬剤を模索した。ニトロイミダゾール環を有する複数の薬剤を GSC のスフェアに投与したところ、図 2 に示すとおり 2 - ニトロイミダゾール化合物が細胞死を誘導した。特に死細胞はスフェアの中心部が多く、低酸素領域に集積して作用していることが示唆された。2 - ニトロイミダゾール化合物が有望な薬剤候補として考えた。ミソニダゾールやエタニダゾールはこれまでの臨床試験において神経毒性の問題が報告されており、神経毒性を軽減する目的で開発されたドラニダゾールを低酸素領域での放射線増感効果および殺細胞効果を有する薬剤候補として次の検

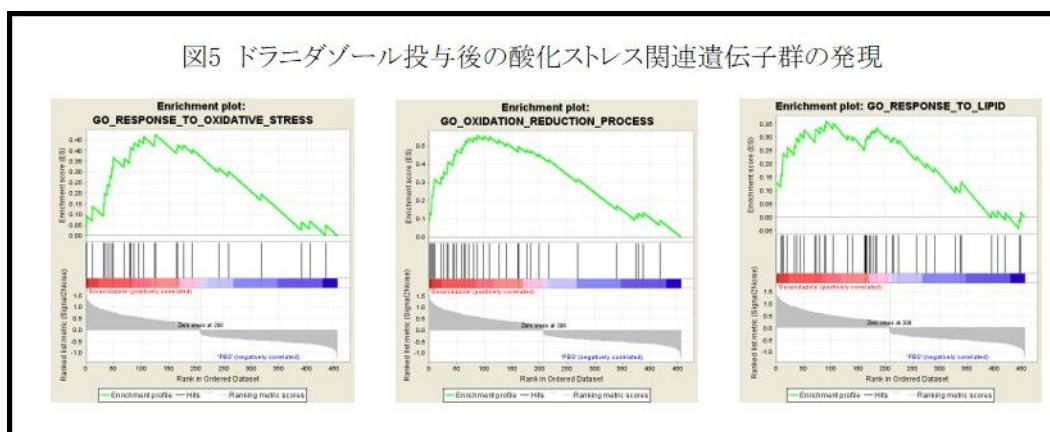


討を進めた。

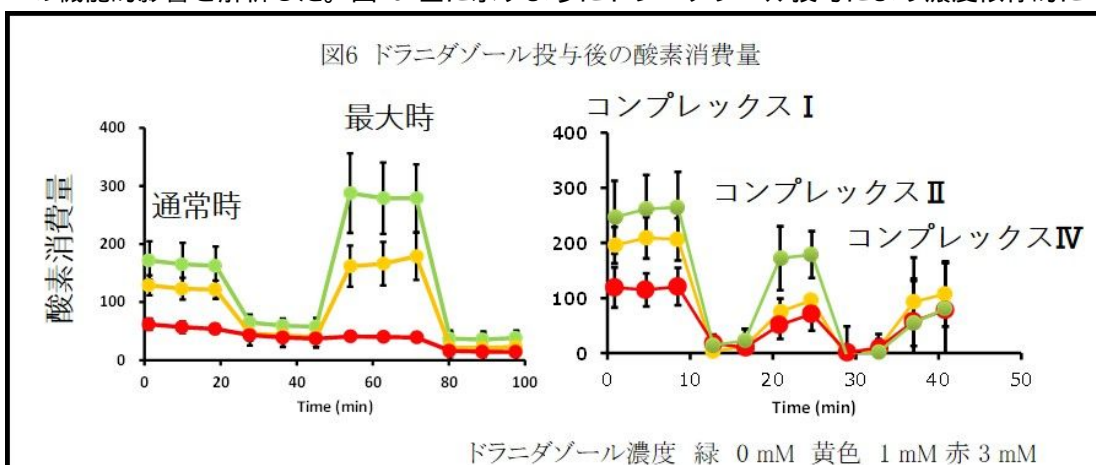
(2) 低酸素環境下においてドラニダゾールを投与することで GSC の放射線増感効果があるかをコロニー形成法で図 3 のように評価した。低酸素環境下ではドラニダゾールを投与することでコロニー形成を低下させることを明らかとなった。作用機序として、低酸素環境下で薬剤が DNA の損傷を固定することがニトロイミダゾール化合物では報告されており、ドラニダゾールにおいても同様の機序を考え、低酸素環境下で DNA 損傷を評価した。図 4 に示すとおり、低酸素環境下ではドラニダゾール投与により DNA の 2 重鎖切断が増加していることが示された。ドラニダゾールは低酸素環境下での放射線増感効果を持ち、その機序として DNA 損傷の固定であることが示された。



(3) 次にドラニダゾールの殺細胞効果を明らかにするために、ドラニダゾール投与後の遺伝子発現解析を行った。図 5 に示す通りドラニダゾール投与により、酸化ストレスが亢進していることが明らかとなった。



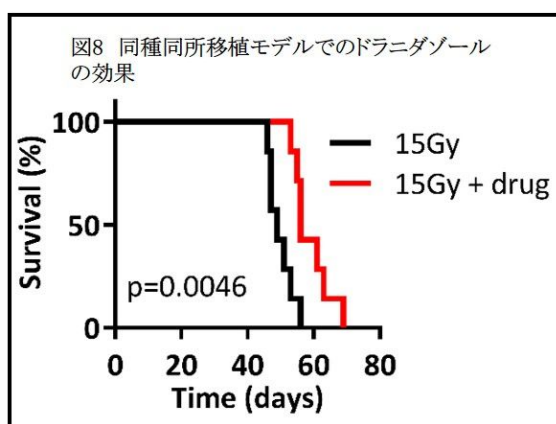
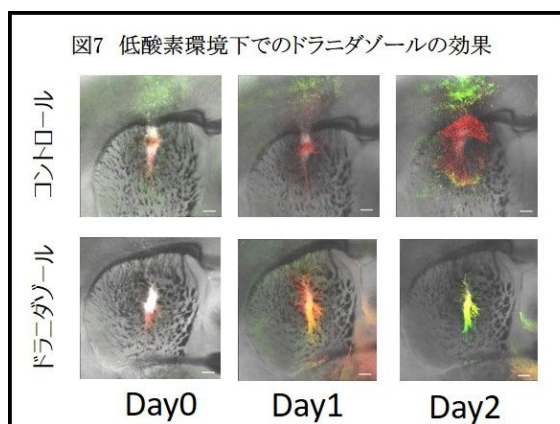
(4) 酸化ストレスと脂質反応が亢進していることから、ドラニダゾールはミトコンドリアへの障害を来していると考え、細胞外フラックスアナライザーでドラニダゾールのミトコンドリアへの機能的影響を解析した。図 6 左に示すようにドラニダゾール投与により濃度依存的にミ



トコンドリアの酸素消費量が減少していることが明らかとなった。また図 6 右に示すようにミトコンドリアの complex I の酸素消費量が減少していることが明らかとなった。以上の結果よりドラニダゾールはミトコンドリアの complex I の機能低下を誘導し酸化ストレス亢進に繋げていることが示唆された。

(5) ドラニダゾールの単剤での効果を脳スライスを用いた *ex vivo* で評価した。図 7 に示すように低酸素環境下で脳スライス中の GSC の増殖は著明に抑制された。ドラニダゾールは脳腫瘍の低酸素領域の放射線増感効果のみならず、殺細胞効果を有することが明らかになり、その有効性を GSC の同種同所移植モデルで検討した。薬剤投与と照射を併用したマウスは照射のみ行ったマウスと比較して有意に生存が延長していることが明らかになった。

以上の結果より、ドラニダゾールは脳腫瘍の低酸素領域の放射線増感効果を有するだけでなく、低酸素領域の腫瘍細胞へのミトコンドリアを介した殺細胞効果を有し有望な薬剤であることが示され、今後の実臨床への導入が期待される結果となった。現在、2-ニトロイミダゾール化合物の腫瘍への集積は ¹⁸F-FMISO を使用した PET-CT で評価でき、ドラニダゾールの有効性のバイオマーカーとして期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsuki Yuji, Yamasaki Juntaro, Suina Kentaro, Okazaki Shogo, Koike Naoyoshi, Saya Hideyuki, Nagano Osamu	4. 巻 111
2. 論文標題 Vasodilator oxyfedrine inhibits aldehyde metabolism and thereby sensitizes cancer cells to xCT targeted therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 127 ~ 136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 サンベトラオルテア、小池直義、佐谷秀行
2. 発表標題 低酸素ニッチ内癌幹細胞の放射線抵抗性の克服戦略
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 サンベトラオルテア、小池直義、佐谷秀行
2. 発表標題 脳腫瘍幹細胞の低酸素応答と放射線抵抗性の克服
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----