

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19209048
 研究課題名（和文） 悪性グリオーマの浸潤性及び治療抵抗性を標的とした新規治療薬の
 開発研究
 研究課題名（英文） Research for development of novel therapeutic approaches targeting
 molecules regulating invasion and drug resistance of malignant
 gliomas
 研究代表者
 佐谷 秀行（SAYA HIDEYUKI）
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：80264282

研究成果の概要：

悪性グリオーマの強い浸潤能と治療抵抗性を規定する分子シグナルを明らかにし、それらに基づく新たな治療戦略の基礎を構築することを目的として研究を行った。具体的には：①悪性グリオーマの浸潤能は細胞外マトリクスの産生能と極めて強い相関を示すので、マトリクスの産生を評価するアッセイ系を確立し、そのアッセイを用いて浸潤能を抑制できる低分子化合物の候補を取得した。②抗がん剤効果が細胞分裂期での停止時間と相関することを見出し、その概念を用いて抗がん剤の効果を判定するシステムを構築した。③ヒトグリオブラストーマおよび PNET に類似した組織型を持つマウス脳腫瘍モデルを構築した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	20,300,000	6,090,000	26,390,000
2008年度	18,500,000	5,550,000	24,050,000
年度			
年度			
年度			
総計	38,800,000	11,640,000	50,440,000

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：①細胞・組織 ②脳腫瘍 ③シグナル伝達 ④癌 ⑤低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマ、特にグリオブラストーマの予後は診断・治療技術の向上にもかかわらず依然として改善せず、その原因は腫瘍細胞の強い浸潤能、そして化学治療・放射線治療に対する抵抗性にあると考えられる。経口型のニトロソウレア系アルキル化剤が登場した

ことによって、わずかでもその治療成績が向上することが期待されるが、本質的に現有の抗がん剤の効果には限界があり、本腫瘍に対しては新たな発想に基づく治療戦略を考案する必要があった。

申請者らは過去に行った研究により、高浸潤性、薬剤抵抗性という悪性グリオーマ

治療における二つの問題点の原因となる分子背景を見出していたので、それらの分子シグナルを標的とした診断治療モデルの構築を行うべき時期に来ていた。

2. 研究の目的

本研究は、悪性グリオーマの強い浸潤能と治療抵抗性を規定する分子メカニズムに基づいた新たな診断治療戦略をデザインし、創薬を推進するための基盤を構築することを目的として行った。具体的には：

- (1) 悪性グリオーマの浸潤能は細胞外マトリクスの産生能と極めて強い相関を示すことを見出しているため、マトリクスの産生を評価するアッセイ系を確立し、各種低分子化合物を用いてスクリーニングを行う。
- (2) 三次元培養システムを応用し、悪性グリオーマの浸潤性を評価するアッセイシステムを構築し、候補となる化合物をテストする。
- (3) 抗がん剤の効果を細胞の酸化ストレスの上昇で検知するシステムを構築し、抗がん剤効果を予測する方法を開発する。
- (4) 悪性グリオーマの動物実験モデルを構築し、上記のアッセイで取得した化合物の効果についてモデル動物を用いてテストする。

3. 研究の方法

- (1) 細胞外マトリクス産生能検出アッセイを用いた浸潤抑制剤の探索

ARPE-19 網膜上皮細胞に TGF- β と TNF- α を加えることによってフィブロネクチンとヒアルロン酸が多量に産生され、細胞が間葉系性質を獲得するアッセイを用いて構造的にバリエーションが多く、重複の少ない数千の低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした。スクリーニングによって同定された低分子化合物の構造に基づいて類似化合物を入手し、それらの効果を再びアッセイ系によって検定した。つづいて活性を持つ構造を基本にして低分子化合物に対して合成展開を行った。

- (2) ヒット化合物による脳腫瘍細胞マトリクス内浸潤能抑制の検定

すでに ADAM17、CD44、ヒアルロン酸合成酵素 HAS3 の siRNA で、マトリゲル中における培養脳腫瘍細胞の浸潤能が抑制できることを確認しているため、同じアッセイ系を用いて上記の実験で得た低分子化合物の評価を行った。

- (3) 抗がん剤感受性を評価するシステムの構築

抗がん剤が腫瘍を殺すメカニズムを明らかにし、それに基づいて抗がん剤の効果を判定する方法を開発した。

- (4) 脳腫瘍発生モデルの構築

マウス神経幹細胞分画に Ras、Myc などのがん遺伝子を導入し、マウス脳内に移植する実験を行い、脳腫瘍モデルの構築を行った。

4. 研究成果

- (1) 細胞外マトリクス産生能検出アッセイを用いた浸潤抑制剤の探索

ARPE-19 網膜上皮細胞に TGF- β と TNF- α を加えることによってフィブロネクチンとヒアルロン酸が多量に産生されると、特徴的な細胞とマトリクスによるフォーカスが形成されることが分かった。(図 1)

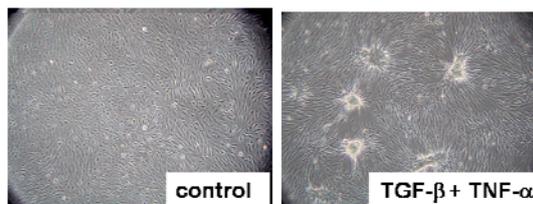


図 1 TGF- β /TNF- α 処理によって形成される fibrotic focus

このフォーカス形成能を指標として化合物ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、約 20 種類の化合物がフォーカス形成を有意に抑制した。そのうち compound X と名付けた化合物は、1 μ M でフォーカス形成を抑制し、さらに脳腫瘍細胞及び転移性乳がん細胞の浸潤を二次元、三次元の双方のアッセイにおいて抑制することが分かった(図 2)。本化合物の作用機序解析、並びに合成展開は現在進行中である。

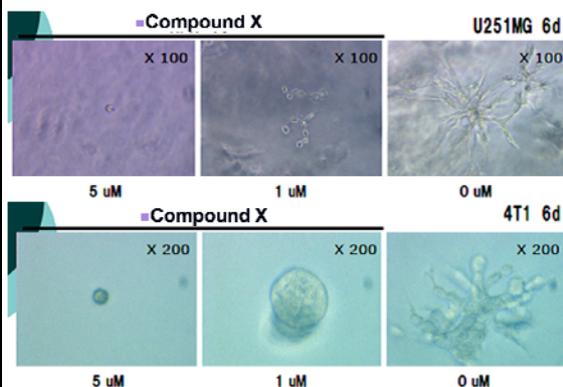


図 2 Compound X によるヒト脳腫瘍細胞(U251)、マウス転移性乳がん細胞(4T1)のマトリクス内浸潤能の抑制

- (2) 抗がん剤感受性を評価するシステムの構築

抗がん剤が腫瘍を殺す際、分裂中期での細胞周期停止時間とその殺細胞効果が比例することを見出した。分裂中期停止時に活性化するシグナルを探索したところ、p38MAPK が活性化していることを見出した。p38MAPK は活

性酸素（ROS）の上昇によって活性化することが知られているため、分裂中期停止時のROSを測定したところ、停止時間に比例してROSが上昇していることが分かった（図3）。

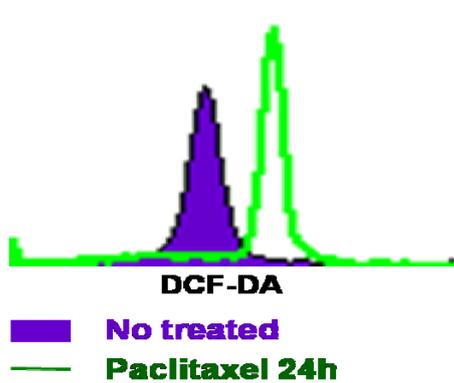


図3 Paclitaxel 処理によって誘導される分裂停止によるROSの上昇

分裂期にROSが上昇するのは、分裂期停止時に糖の取り込みが低下してミトコンドリア依存性にエネルギーが産生されることが一因であることが実験的に示された。そのため糖の取り込みを指標にした抗がん剤の効果判定システムの開発を現在行っている。

(3) 脳腫瘍発生モデルの構築

ヒト悪性脳腫瘍に近似したマウスモデルの構築を行った。まず腫瘍起源細胞の一つと考えられている傍脳室領域（subventricular zone: SVZ）に存在する神経幹細胞（neural stem cell: NSC）および早期前駆細胞を未分化な状態で培養し（具体的には無血清、増殖因子添加培地中で浮遊培養を行う）、それに活性型 H-RasV12 または c-myc をレトロウイルスを用いて過剰発現させ同系マウスの脳内に移植することで腫瘍が発生するのか否かについて検討を行った（図4）。

野生型マウスのSVZから準備したNSCにがん遺伝子を導入しても、腫瘍形成には至らなかった。しかし *Ink4a/Arf*^{-/-}マウスからNSCを準備したところ、活性型 Ras (RasV12) を導入した場合は100%のマウスが2か月以内に脳腫瘍を発症して死亡した。c-myc を導入したマウスの腫瘍発症は RasV12 導入に比べて遅いが、半年で半数のマウスが発症している（図5）。

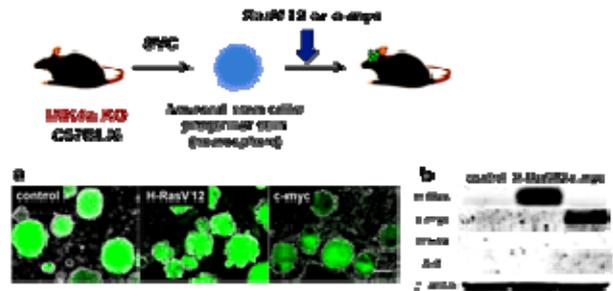


図4 神経幹細胞（及び早期前駆細胞）へのがん遺伝子の導入

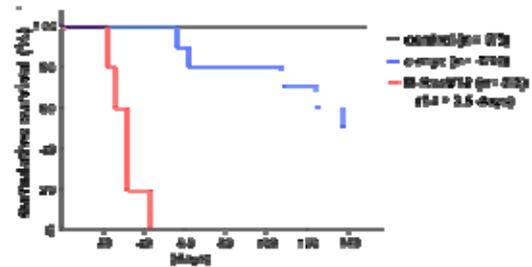


図5 がん遺伝子導入神経幹細胞脳移植マウスの生存曲線

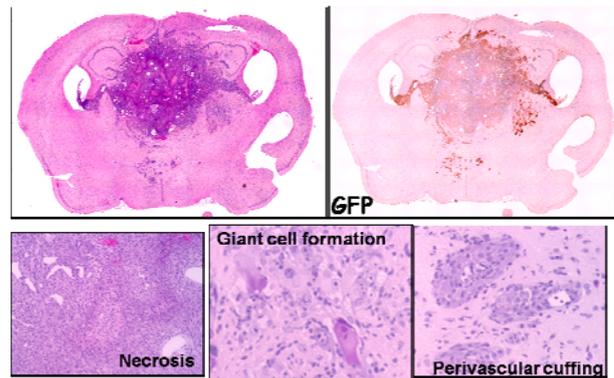


図6 RasV12 導入NSC移植によるマウスグリオブラストーマ様腫瘍の形成

RasV12 では図6に示すように、高い浸潤性を示すグリオブラストーマ様の腫瘍が形成された。また necrosis、巨細胞形成、血管周囲への浸潤などヒトグリオブラストーマに特徴的な病理所見が見られた。

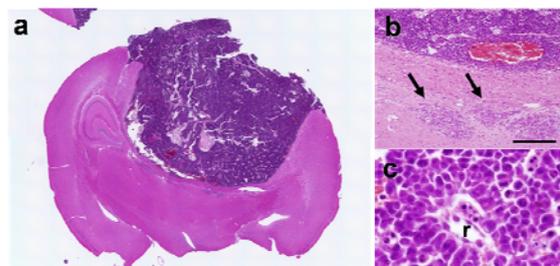


図7 c-myc 導入NSC移植によるマウスPNET様腫瘍の形成

それに対して、c-myc を導入した細胞は未分化な均一な形態を持つ細胞によって構成される primitive neuroectodermal tumor (PNET) 様腫瘍を形成することが分かった (図7)。現在これらのモデルを用いて治療実験を行っている。

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14件)

- ① Inumaru J, Nagano O, Takahashi E, Ishimoto T, Nakamura S, Suzuki Y, Niwa SI, Umezawa K, Tanihara H and Saya H: Molecular mechanisms regulating dissociation of cell-cell junction of epithelial cells by oxidative stress. *Genes Cells* 2009 [Epub ahead of print] 査読有
- ② Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H and Suda T: M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med* 206: 1089-1102, 2009 査読有
- ③ Nakai R, Iida S, Takahashi T, Tsujita T, Okamoto S, Takada C, Akasaka K, Ichikawa S, Ishida H, Kusaka H, Akinaga S, Murakata C, Honda S, Nitta M, Saya H and Yamashita Y: K858, a novel inhibitor of mitotic kinesin Eg5 and antitumor agent, induces cell death in cancer cells. *Cancer Res* 69: 3901-3909, 2009 査読有
- ④ Sampetean O, Iida S, Makino S, Matsuzaki Y, Ohno K and Saya H: Reversible whole-organism cell cycle arrest in a living vertebrate. *Cell Cycle* 8: 620-627, 2009 査読有
- ⑤ Taura M, Eguma A, Suico MA, Shuto T, Koga T, Komatsu K, Komune T, Sato T, Saya H, Li JD and Kai H: p53 regulates TLR3 expression and function in human epithelial cell lines. *Mol Cell Biol* 28: 6557-6567, 2008 査読有
- ⑥ Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A, Saya H, Taketo MM and Oshima M: Activated macrophages promote Wnt signaling through tumor necrosis factor- α in gastric tumor cells. *EMBO J* 27: 1671-1681, 2008 査読有
- ⑦ Arima Y, Inoue Y, Shibata T, Hayashi H, Nagano O, Saya H and Taya Y: Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristics of the epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res* 68: 5104-5112, 2008 査読有
- ⑧ Fumoto K, Lee PC, Saya H and Kikuchi A: AIP regulates stability of Aurora-A at early mitotic phase coordinately with GSK-3 β . *Oncogene* 27: 4478-4487, 2008 査読有
- ⑨ Zhang D, Shimizu T, Araki N, Hirota T, Yoshie M, Ogawa K, Nakagata N, Takeya M and Saya H: Aurora-A overexpression induces cellular senescence in mammary gland hyperplastic tumors developed in p53-deficient mice. *Oncogene* 27: 4305-4314, 2008 査読有

- ⑩ Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H and Araki N: NF1 tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, collapsin response mediator protein-2. *J Biol Chem* 283: 9399-9413, 2008 査読有
- ⑪ Kim S, Park SY, Yong H, Famulski JK, Chae S, Lee JH, Kang CM, Saya H, Chan GK, and Cho H: HBV X protein targets hBubR1, which induces dysregulation of the mitotic checkpoint. *Oncogene* 27: 3457-3464, 2008 査読有
- ⑫ Ohtani N, Imamura Y, Yamakoshi K, Hirota F, Nakayama R, Kubo Y, Ishimaru N, Takahashi A, Hirao A, Shimizu T, Mann DJ, Saya H, Hayashi Y, Arase S, Matsumoto M, Kazuki N and Hara E: Visualizing the dynamics of p21^{Waf1/Cip1} cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15034-15039, 2007 査読有
- ⑬ Kuninaka S, Iida S, Hara T, Nomura M, Naoe H, Morisaki T, Nitta M, Arima Y, Mimori T, Yonehara S and Saya H: Serine protease Omi/HtrA2 targets WARTS kinase to control cell proliferation. *Oncogene* 26: 2395-2406, 2007 査読有
- ⑭ Mori D, Yano Y, Toyo-oka K, Yoshida N, Yamada M, Muramatsu M, Zhang D, Saya H, Toyoshima YY, Kinoshita K, Wynshaw-Boris A and Hirotsune S. NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol* 27: 352-367, 2007 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
- ① Saya H: Analysis of Myc-induced cancer stem cell models. USA-Japan Cooperative Cancer Workshop 'Stem Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis'. 3/28/2009. Hilton Waikoloa Village in Hawaii Big Island. Hawaii
- ② 佐谷秀行: 誘導性腫瘍形成モデルを用いたがん幹細胞の解析。招待講演。第11回泌尿器疾患ゲノム解析研究会。3/14/2009。大阪リーガロイヤルホテル。大阪
- ③ 佐谷秀行: マウスモデルを用いた癌幹細胞の性状解析と応用。シンポジウム3ががん幹細胞。第8回日本再生医療学会総会。3/5/2009。東京国際フォーラム。東京
- ④ Saya H: Role of Hyaluronan-CD44 Interaction in Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Invasion. Invited Speaker. Global Center of Excellence (COE) Program 1st International Symposium. 1/23/2009. Nagoya University School of Medicine. Nagoya
- ⑤ 佐谷秀行: 胎盤からみた細胞周期制御因子APC/cdh1の機能。第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会。シンポジウム。12/11/2008。神戸

- ⑥ 佐谷秀行：癌幹細胞に基づく癌発生及び維持機構の解析。要望講演。第47回日本臨床細胞学会秋期大会。11/14/2008。東京
- ⑦ 佐谷秀行：癌幹細胞モデルの作製と応用。ランチョンセミナー。第67回日本癌学会学術総会。10/30/2009。名古屋国際会議場。名古屋
- ⑧ Saya H: Establishment of osteosarcoma cancer stem cells from mouse bone marrow stromal cells. Invited Speaker. Cancer Genes and Cancer Stem Cells. The 5th Nikko International Symposium 2008, 10/25/2008. Jichi Medical University (JMU) Information and In-service Training Center, Japan
- ⑨ 佐谷秀行：癌の浸潤転移能を決定づける細胞-マトリクス相互作用。教育講演。第41回日本整形外科学会・骨・軟部腫瘍学術学会。7/18/2008。浜松
- ⑩ 佐谷秀行：癌幹細胞について解決すべき諸問題。シンポジウム。第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会。12/11/2007-12/15/2007。横浜
- ⑪ Saya H: Molecular mechanism of anti-cancer therapies. Luncheon Seminar. Organization for Oncology and Translational Research 4th Annual Conference. 11/09/2007-11/10/2007. Kyoto, Japan
- ⑫ 佐谷秀行：Auroraキナーゼの発がんにおける役割。合同シンポジウム5「シグナル伝達研究と分子標的療法」。第69回日本血液学会総会。10/11/2007-10/13/2007。横浜

- ⑬ 佐谷秀行：抗がん剤による細胞死の分子機構。シンポジウム4「細胞死と血液疾患」。第69回日本血液学会総会。10/11/2007-10/13/2007。横浜
- ⑭ 佐谷秀行：抗がん剤治療の分子メカニズム。Meet the Expert Seminar。第66回日本癌学会総会。10/03/2007-10/05/2007。パシフィコ横浜。横浜
- ⑮ 佐谷秀行：細胞-マトリクス間相互作用と癌細胞浸潤。ランチョンセミナー。第25回日本ヒト細胞学会学術集会。08/04/2007。都市センターホテル、東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称： in vitro Fibrotic Focus モデル及び、それを用いた治療薬評価システム

発明者： 佐谷秀行、永野修、丹羽眞一郎、中村賢志、鈴木良美

権利者： 学校法人 慶應義塾、リンク・ジェノミクス(株)

種類： 特許

番号： 特願 2007-209591

出願年月日： 2007年8月10日

国内外の別： 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://genereg.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号： 8 0 2 6 4 2 8 2

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし