

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09491

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫における抗てんかん薬の抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Antitumor effect of antiepileptic drugs on malignant glioma

研究代表者

吉野 篤緒 (YOSHINO, Atsuo)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：50256848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗てんかん薬をエビデンスに基づいて投与を行えば、悪性神経膠腫患者の延命効果に繋がるのではないかと考えている。そこで悪性神経膠腫細胞株(6種)を用いて、抗てんかん薬(標準的な抗てんかん薬4種：CBZ, VAP, LEV, PER)の抗腫瘍効果やその作用機序を検討するとともに、化学療法施行時などにおける最善の投与方法を模索し、治療成績の向上のための基礎的研究を行った。その結果、悪性神経膠腫に対する治療において、PERは細胞増殖抑制効果やアポトーシスの誘導、細胞遊走能の抑制が認められ、他の抗てんかん薬と比べて有益に働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗てんかん薬における悪性神経膠腫に対する抗腫瘍効果を検討した報告はあるが、多剤を比較検討した報告は少ない。また、悪性神経膠腫は高い増殖能と浸潤能のために予後不良とされるが、抗てんかん薬における抗腫瘍効果として細胞遊走能・浸潤能を検討した報告もほとんどない。さらに、悪性神経膠腫に対する標準的的化学療法薬であるTMZとの相乗的な抗腫瘍効果の検討を行った報告も少ない。今回の検討の結果、悪性神経膠腫に対する治療において、perampanelは細胞増殖抑制効果やアポトーシスの誘導、細胞遊走能の抑制が認められ、他の抗てんかん薬(CBZ, VAP, LEV)と比べ抗腫瘍効果として有益に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We believe that evidence from various studies may support that administration of antiepileptic drugs lead to survival benefit for patients with malignant glioma. As a basic research experiment (study) on the administration of antiepileptic drugs in malignant glioma, in this study, using malignant glioma cell lines (6 types: A-172, AM-38, T98G, U-138MG, U-251MG, and YH-13), we investigated the antitumor effect of antiepileptic drugs (4 standard antiepileptic drugs: carbamazepine, sodium valproate, levetiracetam, perampanel) and their mechanisms of antitumor effect. As a result, in the treatment of malignant glioma cells, perampanel displayed a cell growth inhibitory effect, induced apoptosis, and suppressed cell migration ability. Therefore, perampanel may be more beneficial than other antiepileptic drugs for malignant glioma patients.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：抗腫瘍効果 悪性神経膠腫 抗てんかん薬 細胞周期 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫、なかでも膠芽腫は極めて難治性であり治療成績の改善は課題である。現在、temozolomide (TMZ) が化学療法における標準治療薬として用いられているが、延命効果を示すものの、満足すべきものではない。一方、膠芽腫におけるてんかんの発生頻度は 40~60%とされている [Knudsen-Baas KM]。周術期には抗てんかん薬の投与が行われ、てんかん発作の既往があるものには継続的な投与が行われている。しかし、薬剤の相互作用などを理解して抗てんかん薬を投与しているとは言いがたい。

抗てんかん薬の中には、抗腫瘍効果が期待されるものもある。特に、TMZ と valproic acid (VPA)、あるいは新規抗てんかん薬である levetiracetam (LEV) などでは相乗効果も示され [Barker CA, Jabbarli R, Weller M]、抗てんかん薬の抗腫瘍効果に期待がもたれた。しかし、その後の報告では否定的であり、抗けいれん作用以外の効果を期待すべきではないとの報告もある [Happold C]。

一方、glutamate は中枢神経系の主な興奮性神経伝達物質であり、この乱れがてんかんの主な原因ともされている [Choi J, Hanada T]。また、神経膠腫は glutamate を過剰分泌するとともに、glutamate の受容体のひとつである  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体を発現しており、autocrine・paracrine として腫瘍の増大や浸潤などを促進しているとされている [Wirsching HG]。そんな中、AMPA 型グルタミン酸受容体非競合拮抗薬である talampanel と perampanel (PER) が抗てんかん薬として開発された。特に PER は本邦の製薬会社で合成され、2016 年 5 月より本邦においても許可が得られている。抗腫瘍効果が期待される抗てんかん薬である。

## 2. 研究の目的

抗てんかん薬は、エビデンスに基づいた投与を行えば、僅かかもしれないが悪性神経膠腫の延命効果に繋がるのではないかと考えている (抗腫瘍効果を期待した時の用量・投与方法。ステロイドを含む薬剤との相互作用などの十分な知見を得る必要がある)。それにしては、臨床に対する基礎的研究がほとんどない。

本研究は、基礎的実験を通して molecular pharmacology の知見を蓄積し、抗てんかん薬の悪性神経膠腫に対する最善の投与方法を模索し、治療成績の向上に結び付けるものである。

例えば、新規抗てんかん薬に AMPA 型グルタミン酸受容体阻害薬がある。AMPA 受容体が膠芽腫において高発現し、悪性形質維持に必要なシグナル伝達分子である Akt のリン酸化 (活性化) を来すことが明らかになっている。また、AMPA 受容体阻害により増殖・浸潤が抑制されることも示されている [Ishuchi S]。さらに、AMPA 受容体非競合的拮抗剤である talampanel を併用投与した米国での第 II 相臨床試験では、生存期間の延長が報告されている [Grossman SA]。このように、AMPA 受容体阻害抗てんかん薬は、抗腫瘍効果が期待されているが、作用機序等は十分に解明されていない。

一方、本研究は抗てんかん薬に対する再開発 (Drug Repositioning) という側面がある。十分な抗腫瘍効果が認められれば、安全性や薬物動態のデータがあるので、臨床試験などに向けた研究開発の期間を短縮でき、開発費用もかなり節減できる。また、すでに治療薬として使用されており、悪性神経膠腫に直ちに応用できる可能性もある。さらに、brain tumor-related epilepsy における drug-resistant epilepsy の解明にもつながると考えている。

## 3. 研究の方法

悪性神経膠腫細胞株を用いて、各種抗てんかん薬の抗腫瘍効果 (細胞増殖抑制効果、遊走能や浸潤能を含む) や作用機序を検討 (再開発医薬品としても期待) するとともに、化学療法施行時などにおける最善の投与方法を模索し、治療成績の向上に結び付けるために以下の基礎的実験を行ってきた。

(1) 各種抗てんかん薬の抗腫瘍効果：悪性神経膠腫細胞株を用いて、標準的な抗てんかん薬の抗腫瘍効果に対する検討

- ・悪性神経膠腫細胞株としては A-172、AM-38、T98G、U-87MG、U-251MG、YH-13 の 6 種を用いた。
- ・抗てんかん薬としては標準的な carbamazepine (CBZ)、VPA、LEV、そして、新規抗てんかん薬であり AMPA 受容体非競合的拮抗剤である PER の 4 剤の抗腫瘍効果を検討している。
- ・抗腫瘍効果として、細胞増殖抑制効果：①、細胞周期 (停止) への効果：②、apoptosis の誘導：③ など。

(2) 悪性神経膠腫に対する標準化学療法薬である TMZ との併用効果に対する検討

・悪性神経膠腫細胞としては、T98G と U-251MG を用いた (なお、6 種類の細胞株を用いた細胞増殖抑制試験において各種抗てんかん薬の治療域血中濃度で効果を認めやすく、世界的に広く用いられているために、同 2 種類の細胞株を用いた)。

- ・抗腫瘍効果として、細胞増殖抑制効果を検討している。

(3) 抗てんかん薬による細胞遊走能、細胞浸潤能の抑制効果の検討

- ・(2) と同様、悪性神経膠腫細胞としては、T98G と U-251MG を用いた。

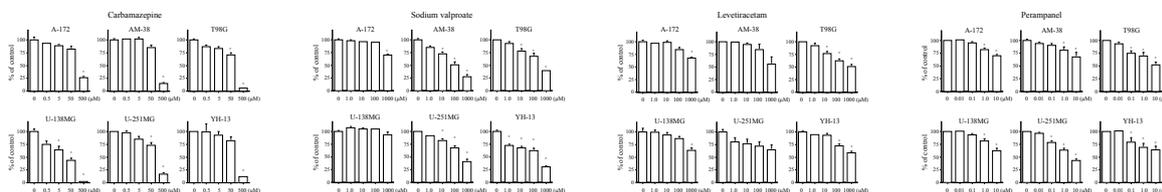
・遊走能は CytoSelect 24-well Cell Migration Assay (Cell Biolabs, Inc. San Diego, CA, USA) を浸潤能は CytoSelect 24-well Cell Invasion Assay (Cell Biolabs, Inc. San Diego, CA, USA) を用いて評価した。

(4) Real-time quantitative reverse transcriptional-PCR を用いて、細胞の遊走能や浸潤能に対する関連遺伝子の mRNA 発現解析

#### 4. 研究成果

##### (1) 各種抗てんかん薬の抗腫瘍効果

##### ①. 細胞増殖抑制効果



CBX : T98G、U-138MG、および U-251MG で濃度依存性の細胞増殖抑制効果が観察された。

VPA : AM-38、T98G、U-251MG、YH-13 では濃度依存的に増殖抑制効果が認められた。

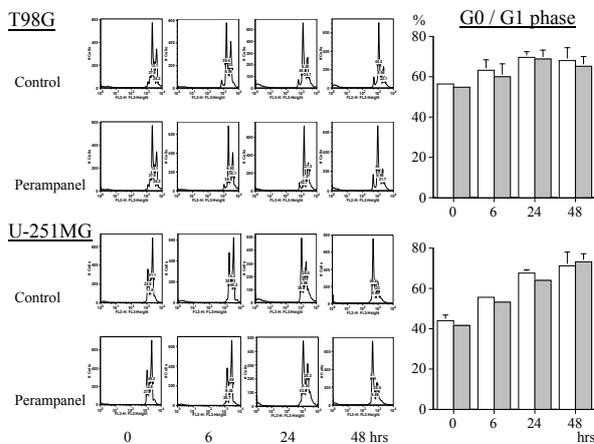
LEV : T98G および YH-13 では濃度依存性の増殖抑制効果が認められた。

PER : 72 時間ですべての細胞株で用量依存的に細胞増殖抑制効果が認められた。

抗てんかん薬のなかで細胞増殖抑制効果が高いのは perampanel と sodium valproate と考えられた。

##### ②. 細胞周期 (停止) への効果

Perampanel において、特に T98G と U-251MG 細胞において、細胞増殖抑制効果を認めたため、同 2 種類の細胞の perampanel 投与における細胞周期の変化を fluorescence activated cell sorter (FACS)にて検討。



##### PERが細胞周期に与える効果

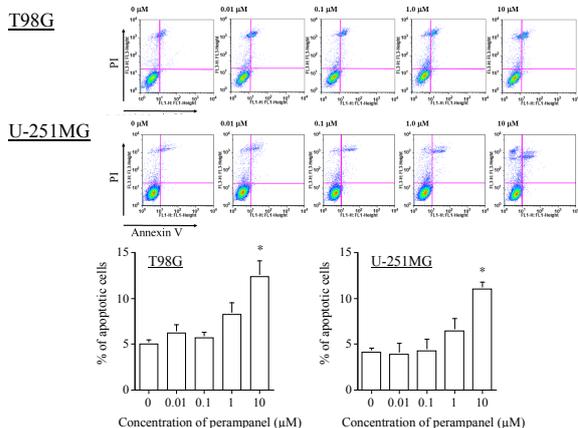
(FACS による細胞周期分布解析)  
各細胞株のヒストグラムの一例とそれぞれの G0/G1 期の細胞の割合を棒グラフで示す。Perampanel 1.0 μM の処理群と等量の DMSO で処理した control 群に分けた。横軸に perampanel 処理後からの時間を 0、6、24、48 時間で示し、縦軸に G0/G1 期の細胞の割合を示した。

T98G、U-251MG 細胞ともに、perampanel 投与後 0 から 48 時間において、G0/G1 期の細胞の割合は control 群と比較し細胞周期の停止を示す差は認められなかった。

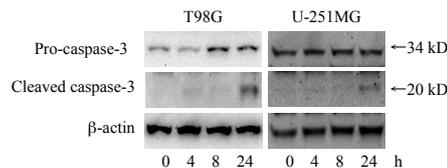
##### ③. apoptosis の誘導

(1) ②と同様に、同 2 種類の細胞における perampanel 投与におけるアポトーシスの誘導を FACS ならびに western blot 解析にて検討。

FACS (下図左) : perampanel 投与による T98G と U-251MG 細胞におけるアポトーシス誘導について、Annexin V と PI の二重染色で flow cytometry を用いて蛍光を計測することで評価した。PER 0、0.1、1.0、10 μM 処理を行い、48 時間後の細胞の状態を評価した。プロット図における初期アポトーシス細胞、後期アポトーシス細胞の合計の割合を比較したグラフを作成した。T98G、U-251MG 細胞ともに 10 μM の PER で control との有意差を示した。Western blot analysis (右) : Cleaved caspase-3 のタンパク質発現は、T98G および U-251MG 細胞の高細胞において、1.0 μM の PER 処理 24 時間後において増加を確認しました。

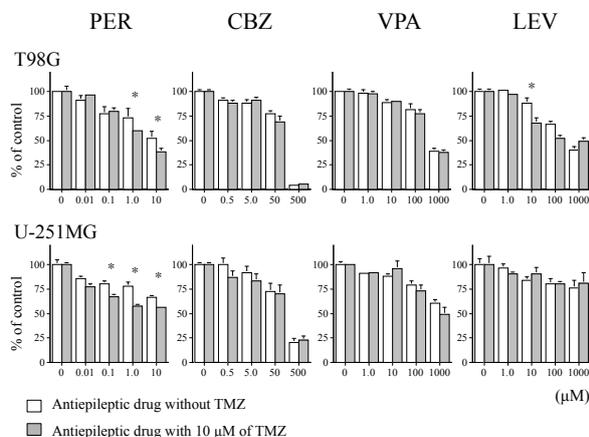


Western blot analysis of proteins associated with apoptosis in T98G and U-251MG cells.



T98G、U-251MG 細胞ともに、perampanel 投与によりアポトーシスが誘導されることが確認された。

(2) 悪性神経膠腫に対する標準化学療法薬である TMZ との併用効果に対する検討  
: TMZ との併用による細胞増殖抑制効果を検討

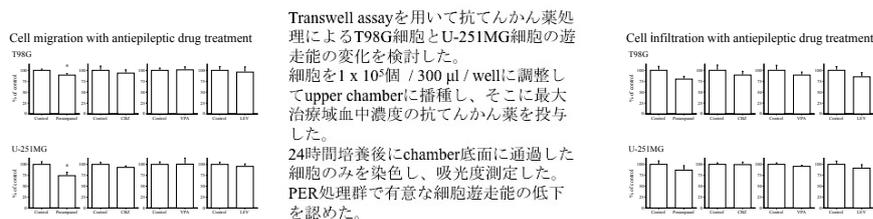


標準化学療法薬である TMZ 処理下において、各種抗てんかん薬を併用した際の細胞増殖抑制試験を行った。6 種類の細胞株から抗てんかん薬の治療域血中濃度で効果を認めやすい T98G と U-251MG を選択した。TMZ 10  $\mu\text{M}$  定量下で、抗てんかん薬はそれぞれの治療域血中濃度を含む範囲で処理し、72 時間培養したのち細胞数を測定した。

Perampanel は T98G、U251-MG 両細胞株で TMZ 併用により治療域血中濃度から細胞増殖抑制効果が増強された。

Levetiracetam は T98G において、10  $\mu\text{M}$  で TMZ 併用により細胞増殖抑制効果が増強された。

(3) 抗てんかん薬による細胞遊走能、細胞浸潤能の抑制効果の検討



Transwell assay を用いて抗てんかん薬処理による T98G 細胞と U-251MG 細胞の遊走能の変化を検討した。細胞を  $1 \times 10^5$  個 / 300  $\mu\text{l}$  / well に調整して upper chamber に播種し、そこに最大治療域血中濃度の抗てんかん薬を投与した。24 時間培養後に chamber 底面に通過した細胞のみを染色し、吸光度測定した。PER 処理群で有意な細胞遊走能の低下を認めた。

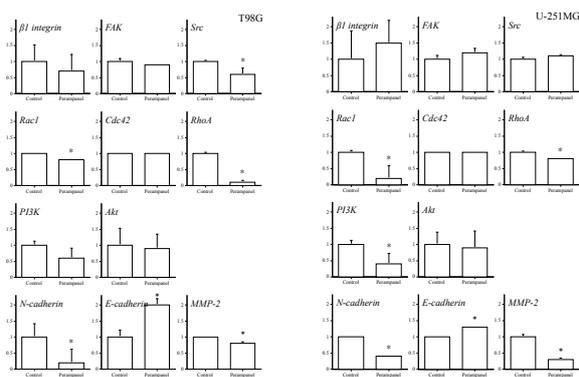
Transwell assay を用いて抗てんかん薬処理による T98G 細胞と U-251MG 細胞の浸潤能の変化を検討した。細胞を  $1 \times 10^5$  個 / 300  $\mu\text{l}$  / well に調整して ECM 層をコートした upper chamber に播種し、そこに最大治療域血中濃度の抗てんかん薬を投与した。24 時間培養後に chamber 底面に通過した細胞のみを染色し、吸光度測定した。すべての抗てんかん薬処理群で細胞浸潤能の低下傾向を示したが、有意差は認めなかった。

T98G および U-251MG において、perampanel 投与群で有意な細胞遊走能の抑制を認めた。その他の抗てんかん薬投与群では細胞遊走能の有意な抑制は認められなかった。

(4) Real-time quantitative reverse transcriptional-PCR を用いて、細胞の遊走能や浸潤能に対する関連遺伝子の mRNA 発現解析

: perampanel 投与により、T98G および U-251MG において、細胞遊走能の抑制を認めたため、epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関連する因子をコードする mRNA の発現について real-time qRT-PCR を用いて評価

: perampanel が遊走能を抑制する機序を検討



EMTに関連する因子をコードするmRNAの発現についてreal-time qRT-PCRを用いて評価した。Perampanel投与4時間後のT98GとU-251MG細胞のtotal RNAを解析すると、*β1 integrin*の発現に有意な変化は認めなかった。*FAK / Src*経路では、T98Gで*Src*の発現が低下していた。*PI3K / Akt*経路では、U-251MGで*PI3K*の発現低下を認めた。細胞骨格を再構築に関与する*Rac1*、*RhoA*の発現は、両細胞株でcontrol群と比較して発現の低下を認めしたが、*Cdc42*の発現は変化していなかった。また、間葉系マーカーである*N-cadherin*、*MMP-2*は両細胞株でcontrol群と比較して発現が低下している一方で、上皮系マーカーである*E-cadherin*は発現が亢進していた。

Perampanel 処理後に、細胞の遊走や浸潤に重要なプロセスである EMT に関連する因子について評価したところ、細胞骨格を再構築して細胞の運動性を亢進させる *Rac1*、*RhoA*、間葉系マーカーである *N-cadherin* や *MMP-2* の発現が低下した。一方で、細胞間接着性を強固にして細胞の運動性を低下させる上皮系マーカーである *E-cadherin* の発現は亢進していた。

Perampanel により細胞遊走能が抑制される機序として、細胞骨格の再構築に影響する *Rac1* や *RhoA* の発現を低下させ細胞形態の変化が起こりにくくする。また *E-cadherin* の発現上昇と *N-cadherin* の発現低下により EMT が抑制され、細胞間の接着性が強固となり、細胞の運動性を低下させることが考えられた。

#### (5) まとめ

悪性神経膠腫細胞株において、4 種類の抗てんかん薬 perampanel、sodium valproate、levetiracetam、carbamazepine のなかで、perampanel は細胞増殖抑制だけでなく temozolomide 併用時での細胞増殖抑制効果の増強作用、細胞遊走能抑制の抗腫瘍効果を持つことが明らかになった。悪性神経膠腫に対する治療において、perampanel は他の抗てんかん薬よりも抗腫瘍効果の点で有益に働く可能性が示唆された。

#### 参考文献

- Barker CA, Bishop AJ, Chang M, *et al.* Valproic acid use during radiation therapy for glioblastoma associated with improved survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013 Jul 1;86(3):504-9.
- Choi J, Stradmann-Bellinghausen B, Yakubov E, *et al.* Glioblastoma cells induce differential glutamatergic gene expressions in human tumor-associated microglia/macrophages and monocyte-derived macrophages. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(8):1205-13.
- Grossman SA, Ye X, Piantadosi S, *et al.* NABTT CNS Consortium. Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010 Apr 15; 16(8):2443-9.
- Hanada T, Hashizume Y, Tokuhara N, *et al.* A novel, orally active, noncompetitive AMPA-receptor antagonist that reduces seizure activity in rodent models of epilepsy. *Epilepsia.* 2011 Jul 1; 52(7):1331-40.
- Happold C, Gorlia T, Chinot O, *et al.* Does Valproic Acid or Levetiracetam Improve Survival in Glioblastoma? A Pooled Analysis of Prospective Clinical Trials in Newly Diagnosed Glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2016 Mar 1;34(7):731-9.
- Ishiuchi S, Tsuzuki K, Yoshida Y, *et al.* Blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nat Med* 8: 971-978, 2002.
- Jabbarli R, Ahmadipour Y, Rauschenbach L, *et al.* How about Levetiracetam in Glioblastoma? An Institutional Experience and Meta-Analysis. *Cancers (Basel).* 2021 Jul 27;13(15):3770.
- Knudsen-Baas KM, Engeland A, Gilhus NE, *et al.* Does the choice of antiepileptic drug affect survival in glioblastoma patients? *J Neurooncol.* 2016 Sep;129(3):461-469.
- Weller M, Gorlia T, Cairncross JG, *et al.* Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma. *Neurology.* 2011 Sep 20;77(12):1156-64.
- Wirsching HG, Weller M. Does Neuronal Activity Promote Glioma Progression? *Trends Cancer.* 2020 Jan;6(1):1-3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 龍岡樹里、八木千裕、小澤祥成、花島裕也、吉村相大、山室 俊、角 光一郎、佐野恵海子、鈴木 穰、原 弘之、吉野篤緒
2. 発表標題 Perampanelの抗腫瘍効果
3. 学会等名 37回日本脳腫瘍学会学術集会
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
研究分担者	角 光一郎  (SUMI Koichiro)  (20838479)	日本大学・医学部・助教    (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------