

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：17201
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：19K16804
研究課題名(和文) 分化関連遺伝子NDRG1を標的としたグリオブラストーマの新規治療創出研究

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach against glioblastoma targeting differentiation-related gene, NDRG1

研究代表者
伊藤 寛 (Ito, Hiroshi)
佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50795375
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)：グリオブラストーマ(GBM)は予後不良な悪性脳腫瘍である。N-myc downstream regulated gene1(NDRG1)は分化関連遺伝子で様々ながんの予後良好因子である。これまでNDRG1発現はGBM患者予後に正に相関し、GBM細胞増殖を抑制することを報告した。本研究はNDRG1によるGBM細胞の増殖抑制機序や、DIF-1のNDRG1発現誘導機序の解明、新しいNDRG1標的治療の創出を目的とした。結果、DIF-1はGBM細胞のNDRG1発現を誘導、増殖を抑制し、脳移植GBMのNDRG1発現誘導、増殖抑制を示した。DIF-1によるNDRG1標的治療はGBMの有望な治療になりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NDRG1は腫瘍抑制的な働きが注目されているが、NDRG1を標的とした治療はない。本研究では、NDRG1による細胞の増殖抑制機序や、NDRG1発現を誘導するDIF-1の作用機序を解明することで、NDRG1を標的とした患者予後を改善する新たなGBM治療を提示する事ができる点に学術的、社会的に意義がある。さらに、本研究の成果はGBM治療に新たな治療を提示するばかりでなく、NDRG1が腫瘍抑制的に機能する他がん腫を含めたがん治療に大きく貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GBM) is the most aggressive primary brain tumor. It had been reported that N-myc downstream regulated gene1 (NDRG1) suppresses oncogenesis in various cancers. We had reported that NDRG1 protein expression correlates with favorable prognosis in patients with GBM, and NDRG1 overexpression suppresses GBM cell growth. In this study, we further asked how NDRG1 suppresses GBM cell growth. Further, we showed Differentiation inducing factor-1 (DIF-1) increases NDRG1 expression in GBM cells and its mechanism. Finally, we presented enhancing NDRG1 expression could be a promising approach to the development of potent and novel anti-GBM therapeutics.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 NDRG1 DIF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- 1) GBMは最も頻度が高く、極めて致死率の高い悪性原発性脳腫瘍である。現在の標準治療では、手術・放射線治療・アルキル化剤のテモゾロミドを用いた化学療法が行われているが、患者の平均生存期間は14.6ヶ月と未だ予後不良である。近年、GBMの発生・進展に関わる遺伝子変異が明らかになり、それらと関連する分子を標的とした様々な薬剤の臨床治験が多く進められている。しかし、患者の全生存期間を延長した薬剤は未だ報告されていない。そのため、GBMの悪性進展に関わる特徴的な分子とその関与機序を明らかにし、それを標的とした有効な治療を創出することは重要な課題である。
- 2) NDRG1は、神経組織を含む様々な組織・器官の分化に関与し、がん遺伝子として知られるN-mycやc-Mycによって負に制御される遺伝子である。これまでに、NDRG1は様々ながん種において腫瘍増殖や血管新生、転移を抑制することが報告されている。さらに、GBMを含むGlioma患者においてもNDRG1が高発現している患者は生存期間が長いことが報告されている。しかし、NDRG1がGBMの進展に関与する詳細な機序は解明されていない。
- 3) 我々は当院で加療したGBM患者の腫瘍標本を対象に、NDRG1発現と患者生存期間が有意に正に相関することを明らかにした。また、GBMの悪性進展に関与する遺伝子異常(EGFR過剰発現、PTEN・TP53変異)に関わらず、NDRG1発現抑制はGBM細胞株の増殖を促進した。
- 4) さらに我々は、独自に樹立したNDRG1過剰発現GBM細胞株では細胞増殖が有意に抑制され、NDRG1のリン酸化酵素であるGlycogen synthase kinase 3 (GSK3)の発現と、GBMの悪性進展に関わる生存・増殖シグナルのAKT/S6経路の活性が低下することを観察した。
- 5) また、我々はDictyostelium discoideumの分化に関わる物質Differentiation inducing factor-1 (DIF-1)が、GBM細胞のNDRG1発現を上昇させ、細胞増殖を有意に抑制し、さらにGBM細胞株マウス皮下移植腫瘍の増殖も抑制することを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、NDRG1による細胞の増殖抑制機序や、NDRG1発現を誘導するDIF-1の作用機序を解明し、NDRG1を標的とした患者予後を改善する新たなGBM治療を提示することである。

3. 研究の方法

- 1) NDRG1の発現をsiRNAや独自に作成したNDRG1過剰発現細胞株を用いて変動させ、さらにGSK3阻害剤などを用いてNDRG1発現によるGBM細胞増殖抑制機序とそのGSK3やAKT/S6シグナルの関連を評価した。
- 2) GBM細胞株や患者由来GBM幹細胞株を用いて、DIF-1処理によるNDRG1発現やその関連シグナル、増殖の変化をウエスタンブロット、フローサイトメトリなどで評価した。
- 3) GBM細胞株や患者由来GBM幹細胞株のマウス同所移植モデルを作成し、DIF-1が脳へ移行するか、抗腫瘍効果を示すか評価した。

4. 研究成果

これまでに我々は当院で加療したGBM患者の腫瘍標本を対象に、NDRG1発現と患者生存期間が有意に正に相関することを明らかにした。NDRG1過剰発現GBM細胞株では細胞増殖が有意に抑制され、NDRG1のリン酸化酵素であるGSK3の発現と、GBMの悪性進展に関わる生存・増殖シグナルのAKT/S6経路の活性が低下することを観察した。また、DIF-1が、GBM細胞のNDRG1を脱リン酸化するとともに発現を顕著に上昇させ、細胞増殖を有意に抑制し、さらにGBM細胞株マウス皮下移植腫瘍の増殖も抑制することを見出した。これらの結果を基盤として、(A) NDRG1によるGBM細胞の増殖抑制機序の解明、(B) DIF-1によるGBM細胞のNDRG1発現制御・細胞増殖抑制機序の解明、(C) DIF-1投与による生体でのNDRG1発現上昇や関連シグナル抑制効果の検証を進めた。

(A) NDRG1によるGBM細胞の増殖抑制機序の解明

NDRG1ノックダウンによる細胞増殖促進効果やAKT/S6活性の上昇は、GSK3阻害剤によって打ち消された。GSK3阻害剤はGBM細胞株のS6活性をNDRG1ノックダウン細胞においてより抑制することを見出した。これは、NDRG1発現の変化による細胞増殖の制御機構にGSK3やAKT/S6活性が関与していることを示している。さらに、NDRG1過剰発現は細胞周期のG0/1期停止を誘導することをフローサイトメトリーを用いて明らかにした。

NDRG1 過剰発現は GSK3 蛋白の安定性を低下することをシクロヘキシミド処理後、経時的にウェスタンブロットで GSK3 発現を検討し見出した。NDRG1 過剰発現による GSK3 安定性低下はプロテアソーム阻害剤である MG132 処理で打ち消された。これは NDRG1 発現上昇は GSK3 のプロテアソームによる分解を促進することでその発現を低下させることを示唆している。一方で NDRG1 リン酸化部位欠損変異 cDNA を作成し、GBM 細胞株に強制発現させ、その増殖を評価したところ、NDRG1 リン酸化部位欠損変異強制発現細胞は野生型 NDRG1 強制発現細胞に比し、増殖がより抑制されることがわかった。NDRG1 リン酸化部位欠損変異体は細胞内での蛋白の安定性が野生型に比し上昇していることを経時的なウェスタンブロットで明らかにした。これは NDRG1 リン酸化は NDRG1 蛋白の安定性低下に関わることを示している。事実、NDRG1 リン酸化担当キナーゼである GSK3 阻害剤を処理すると NDRG1 リン酸化が阻害され、NDRG1 蛋白の安定性が上昇した。以上の結果より、NDRG1 発現上昇は GSK3 の安定性を低下させ、その発現を抑制する。さらに GSK3 の発現低下は NDRG1 リン酸化の低下によって NDRG1 の発現安定性を上昇させることを示している。

(B) DIF-1 による GBM 細胞の NDRG1 発現制御・細胞増殖抑制機序の解明

DIF-1 処理により、GBM 細胞株や患者由来 GBM 幹細胞株の増殖は抑制され、NDRG1 の発現上昇、GSK3 の発現低下、AKT/S6 活性の低下、G0/1 期停止が観察された。この DIF-1 処理による細胞増殖抑制は siRNA による NDRG1 ノックダウンによって打ち消され、GSK3 発現低下や AKT 活性の低下が打ち消されることもウェスタンブロットによって観察された。これは DIF-1 による GBM 細胞増殖抑制は NDRG1 発現上昇や GSK3 発現低下、AKT 活性の低下によるものであることを示している。さらに DIF-1 処理は NDRG1 過剰発現時と同様に NDRG1 発現の安定性を上昇させ、GSK3 の安定性を低下させることを確認した。

(C) DIF-1 投与による生体での NDRG1 発現上昇や関連シグナル抑制効果の検証

まず GBM 細胞株の皮下移植モデルマウスを作成し、DIF-1 経口投与を行った。皮下移植腫瘍の増殖は DIF-1 投与により抑制され、摘出腫瘍のウェスタンブロットでは NDRG1 発現上昇や GSK3 発現低下、AKT 活性の低下が観察された。

次に、DIF-1 投与マウスの脳を採取し、HPLC で DIF-1 を検出可能であった。さらに DIF-1 投与脳での NDRG1 発現の上昇も確認できた。

最終的に、患者由来 GBM 幹細胞株の同所移植モデルマウスを作成し DIF-1 経口投与を行った。同様に同所移植腫瘍の増殖は DIF-1 投与で抑制された。

これらの結果により、DIF-1 は血液脳関門を通過し脳内に分布し同所移植腫瘍の増殖を抑制することが示された。

以上の結果より、DIF-1 は GBM 細胞の NDRG1 発現を上昇することで、GSK3 安定性低下による発現低下や AKT/S6 活性の抑制、G0/1 期誘導によってその細胞増殖を抑制する。DIF-1 は血液脳関門を通過し、脳移植腫瘍の増殖を抑制した。DIF-1 は生体においても NDRG1 発現上昇による GBM への抗腫瘍効果を有する有望な治療であることが示された。

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 Ito H, Watari K, Shibata T, Miyamoto T, Murakami Y, Nakahara Y, Izumi H, Wakimoto H, Kuwano M, Abe T, Ono M	4. 巻 80(2)
2. 論文標題 Bidirectional Regulation between NDRG1 and GSK3 Controls Tumor Growth and Is Targeted by Differentiation Inducing Factor-1 in Glioblastoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer research	6. 最初と最後の頁 234-248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-0438.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 寛, 渡 公佑, 村上 雄一, 柴田 智博, 中原 由紀子, 阿部 竜也, 桑野 信彦, 小野 真弓
2. 発表標題 NDRG1を標的としたGSK3 /AKT/S6シグナル阻害を介するグリオブラストーマの新規治療創出研究
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 寛, 高口 素史, 中原 由紀子, 増岡 淳, 阿部 竜也
2. 発表標題 膠芽腫細胞におけるNDRG1/GSK3 の双方向性の制御を標的とした新規治療法の開発.
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤寛, 渡公佑, 柴田智博, 村上雄一, 中原由紀子, 相島慎一, 桑野信彦, 小野真弓, 脇本浩明, 阿部 竜也
2. 発表標題 NDRG1はGSK3 発現制御を介し膠芽腫細胞の増殖や細胞周期を抑制する予後良好因子である
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------