

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591730

研究課題名(和文) 高分子ミセル抗癌剤のCED法への応用

研究課題名(英文) Therapeutic effect of the polymeric micellar antineoplastic drugs infused convection-enhanced delivery against intracranial rat glioma models

研究代表者

山下 洋二(YAMASHITA YOJI)

宮城県立がんセンター・研究所・特任研究員

研究者番号：30420045

研究成果の概要(和文)：高分子ミセルに内包する薬剤候補として、悪性神経膠腫治療の中心となっているアルキル化剤に注目し、高分子ミセルへの封入を試みたが、薬剤の封入効率が悪く、完成度の高い製剤の調製に至らなかった。そこで高分子ミセル抗癌剤のターゲットとなる新たな分子を同定する目的で、悪性神経膠腫手術検体におけるプロテインホスファターゼファミリー一遺伝子の発現異常をスクリーニングし、その中で発現量が顕著に上昇しているものの一つとしてCDC25Aを、発現が顕著に下がっているものとしてDUSP26を同定し、解析した。

研究成果の概要(英文)：Convection-enhanced delivery (CED) is a local infusion technique, which delivers chemotherapeutic agents directly to the central nervous system, circumventing the blood brain barrier and reducing systemic side effects. Although it is regrettable that we could not prepare polymeric micellar alkylating agents for CED in this project, we identified the candidate molecules for the treatment of malignant glioma, CDC25A and DUSP26, in the process of screening the aberrant expression of protein phosphatases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脳腫瘍学、化学療法

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は悪性神経膠腫治療に保険診療上使用可能な塩酸ニムスチン(ACNU)を用い、ラット脳腫瘍モデルにおけるその有用性・安全性について報告し、従来の抗癌剤のCED法への応用・転用を提唱してきた。しかしながら、毒性の軽減が必要と考えられ、水溶性薬剤の短い半減期の問題が明らかとな

った。また難水溶性薬剤を用いた場合は不十分な薬剤分布の問題と溶媒の脳毒性の問題等が存在した。そこで、高分子ミセル抗癌剤に注目し、CED法への応用を試みた。CED法に高分子ミセル抗癌剤を用いることによる効果は未だ明らかではないが、難水溶性薬物の可溶化による薬剤分布の改善、機能粒子としての薬剤の運搬・薬剤放出制御により、最高細胞暴露濃度低減・毒性軽減・治療域の拡

大が期待される。本研究の申請前に、アドリアマイシン (ADR) を内包した高分子ミセルを CED 法によりラット脳内投与し、薬剤分布を ADR の蛍光を利用し観察したところ、キャリアのない遊離型 ADR に比して有意に広範な薬剤分布が明らかとなり、CED 法におけるミセルキャリアの有用性が明らかとなった。

そこで今回、悪性神経膠腫治療における「高分子ミセル抗癌剤の CED 法への応用」に関する研究を考案した。

2. 研究の目的

研究開始当初は共同研究施設である神奈川県科学技術アカデミーの横山「高分子ナノメディカル」プロジェクトにおいて作製された高分子ミセル抗癌剤を用いた解析を予定していた。悪性神経膠腫治療の中心となっているアルキル化剤の封入を試みたが、封入の効率が悪く、完成度の高い製剤の調製に至らなかった。

そこで高分子ミセル抗癌剤のターゲットとなる悪性神経膠腫治療の新たな分子標的を同定する目的で、悪性神経膠腫の手術摘出検体におけるプロテインホスファターゼファミリーに属する遺伝子の発現異常の有無をスクリーニングし、候補分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

悪性神経膠腫の手術摘出検体を用い、プロテインホスファターゼファミリーに属する遺伝子の発現異常の有無をリアルタイム PCR の手法を用いて解析した。その中で発現量が顕著に上昇しているものの一つとして CDC25A が、発現が顕著に下がっているものとして DUSP26 が同定され、下記項目を解析した。

(1) CDC25A と細胞増殖

悪性神経膠腫の細胞増殖と CDC25A の関係を明らかにするために、①CDC25A 発現量と細胞増殖の指標である Ki-67 ラベリングインデックスとの相関、②CDC25A 阻害剤と CDC25AsiRNA 処理による細胞増殖への影響を解析した。

(2) DUSP26 による細胞制御

DUSP26 の脳における機能解明、およびその破綻と悪性神経膠腫との関係を明らかにするために、①基質を同定する事、②その脱リン酸化の意義を明らかにする事を目的とし、酵母 2 ハイブリッドスクリーニングにより、DUSP26 の結合タンパクを同定し、そのタンパクの脱リン酸化による機能の制御を解

析した。

4. 研究成果

(1) CDC25A と細胞増殖

以下の 4 項目を明らかにした。

- ① 悪性神経膠腫の手術摘出検体における CDC25AmRNA 発現量は細胞増殖の指標である Ki-67 ラベリングインデックスと有意に相関することを見いだした。
- ② CDC25AmRNA 発現量の上昇は神経膠腫由来の各種樹立細胞株においても認められることを見いだした。
- ③ 神経膠腫樹立細胞株の細胞増殖は CDC25A 阻害剤と CDC25AsiRNA 処理により抑制されることを見いだした。
- ④ 神経膠腫樹立細胞株において、CDC25A 阻害剤と CDC25AsiRNA 処理により細胞死の誘導が認められることを見いだした。

以上の結果より、CDC25A が悪性神経膠腫治療の新たな分子標的であることが示唆された。

(2) DUSP26 による細胞制御

酵母 2 ハイブリッドスクリーニングにて、DUSP26 の結合タンパクとして KIF3A が得られ、DUSP26 が、神経膠腫細胞の悪性度のマーカー、さらには治療の標的となることが考えられた。

KIF3A は、KIF3B と KAP3 と共に 3 量体を作り、微小管において様々な cargo を運搬する作用をモータータンパクであることが知られていたため、DUSP26 の KIF3 モーターへの影響を調べ、以下の事が明らかとなった。

- ①DUSP26 は、KAP3 を特異的に脱リン酸化する。
- ②DUSP26 はホスファターゼ活性依存的に細胞の接着を強める。
- ③DUSP26 は、ホスファターゼ活性依存的に N-cadherin や β -catenin の膜への輸送を増強する。

以上の結果より、DUSP26 は正常のアストロサイトにおいて細胞の接着に重要な働きを持ち、その発現が減少していることが、悪性神経膠腫細胞の高い浸潤性と関係があることが示唆された。

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 4 件)

- ① Yamashita Y, Kasugai I, Sato M, Tanuma

- N, Sato I, Nomura M, Yamashita K, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T, Katakura R, Shima H. CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. J Neurooncol 100:43-49, 2010. 査読有
- ② Yokosawa M, Sonoda Y, Sugiyama S, Saito R, Yamashita Y, Nishihara M, Satoh T, Kumabe T, Yokoyama M, Tominaga T. Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts. Tohoku J Exp Med 221:257-264, 2010. 査読有
- ③ Tanuma N, Nomura M, Ikeda M, Kasugai I, Tsubaki Y, Takagaki K, Kawamura T, Yamashita Y, Sato I, Sato M, Katakura R, Kikuchi K, Shima H. Protein phosphatase Dusp26 associates with KIF3 motor and promotes N-cadherin-mediated cell-cell adhesion. Oncogene 28:752-761, 2009. S 査読有
- ④ Inoue T, Yamashita Y, Nishihara M, Sugiyama S, Sonoda Y, Kumabe T, Yokoyama M, Tominaga T. Therapeutic efficacy of a polymeric micellar doxorubicin infused by convection-enhanced delivery against intracranial 9L brain tumor models. Neuro Oncol 11:151-157, 2009 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① Yamashita Y : CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. 7th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, Seoul (Korea), June10-12 (2010)
- ② 田沼延公: 脳腫瘍におけるDUSP26発現低下とその意義. 第4回日本プロテインホスファターゼ研究学術集会, 熊本, 11月13-14日(2009)
- ③ 島礼: 脳腫瘍におけるホスファトーム異常の解析. 第4回日本プロテインホスファターゼ研究学術集会, 熊本, 11月13-14日(2009)
- ④ 山下洋二: 神経膠腫検体および神経膠腫樹立細胞株を用いた CDC25A の解析. 第27回日本脳腫瘍学会, 大阪, 11月8-10日(2009)
- ⑤ 春日井勲: 悪性神経膠における CDC25 の発現異常. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 10月21-24日(2009)
- ⑥ 山下洋二 : 神経膠腫検体および神経膠腫樹立細胞株を用いた CDC25A の解析.

(財)日本脳神経外科学会 第68回学術総会, 東京, 10月14-16日(2009)

- ⑦ 山下洋二: Analysis of CDC25 genes in malignant glioma samples. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月1-3日(2009)
- ⑧ 田沼延公: Down regulation of DUSP26 may contribute to malignant phenotype of glioma. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月1-3日(2009)
- ⑨ 山下洋二: 神経膠腫検体および神経膠腫樹立細胞株を用いた CDC25A の解析. 第10回日本分子脳神経外科学会, 岡山, 9月19-20日(2009)
- ⑩ 田沼延公: 神経膠腫で発現が認められるプロテインホスファターゼ、DUSP26 は KIF3 モーターを制御し細胞間接着に働く. 第10回日本分子脳神経外科学会, 岡山, 9月19-20日(2009)
- ⑪ 山下洋二: 高分子ミセル抗癌剤の convection-enhanced delivery 法への応用. 第24回日本DDS学会, 東京, 6月29-30日(2008)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.pref.miyagi.jp/mcc/htdocs/kenkyu/yakubutu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 洋二 (YAMASHITA YOJI)
宮城県立がんセンター (研究所)・特任研究
員
研究者番号：30420045

(2)研究分担者

横山 昌幸 (YOKOYAMA MASAYUKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20220577

園田 順彦 (SONODA YUKIHIKO)
東北大学・病院・講師
研究者番号：90302140

(3)連携研究者

島 礼 (SHIMA HIROSHI)
宮城県立がんセンター (研究所)・薬物療法
学部・部長
研究者番号：10196462

田沼 延公 (TANUMA NOBUHIRO)
宮城県立がんセンター (研究所)・薬物療法
学部・研究員
研究者番号：40333645

野村 美有樹 (NOMURA MIYUKI)
宮城県立がんセンター (研究所)・薬物療法
学部・技師
研究者番号：40390893