

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592162

研究課題名(和文) Vandetanibによるグリオーマ播種病変制御の試み

研究課題名(英文) The attempt of control of glioma dissemination lesions in Vandetanib

研究代表者

渡辺 高志 (Watanabe, Takashi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00175100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はEGFR/VEGF dual inhibitorであるVandetanibを使用してグリオーマ細胞における腫瘍抑制効果と播種制御について検討した。ラットC6グリオーマ細胞においてVandetanibはin vitro studyでは腫瘍増殖抑制、浸潤抑制及びアポトーシス誘導効果がみられた。ヒト膠芽腫細胞においても同様の傾向が見られたが、MGMT陽性細胞株においては有意な抑制は得られなかった。MGMT陽性細胞株においてMGMT siRNAを導入して同様の結果を行ったが、反応性は改善したが有意差は得られなかった。ラット播種モデルを使用した研究を行うにはさらなる調査が必要である。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the effects of tumor suppression and the control of dissemination with EGFR/VEGF dual inhibitor, Vandetanib in glioma cells. Vandetanib indicated the suppression of tumor proliferation and invasion and induced apoptosis in rat C6 glioma cells using several in vitro studies. Same tendency was recognized in human glioblastoma cell lines, but significant suppression was not obtained in MGMT-positive human glioblastoma cell lines. We transfected MGMT siRNA into the MGMT-positive cell lines and performed same experiments. We could confirm the improvement of reactivity of Vandetanib treatment, but not obtain the significant results. It is necessary to do further research to perform the experiment with rat dissemination models.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：Vandetanib グリオーマ 播種

1. 研究開始当初の背景

- (1) グリオーマは成人の大脳半球に好発する神経外胚葉性腫瘍であり、その中で最も悪性度が高い膠芽腫は、平均生存期間が15カ月、5年生存率は10%未満と非常に予後が悪いことが知られている。現在の治療方針としては、手術で可能な限り腫瘍を摘出後に放射線化学療法を追加するのが標準的である。しかしグリオーマは化学療法や放射線療法に対する感受性があまり高くないため、手術による腫瘍摘出度が予後に強く影響を及ぼす。腫瘍は正常脳組織を破壊しながらびまん浸潤性に増殖するため、手術による全摘出は困難であったが、近年の様々なモダリティーを使用した手術手技の進歩により、手術による腫瘍摘出度は向上しつつある。また2013年より承認されたBCNU wafer や IMRT (強度変調放射線治療) や BNCT (ホウ素中性子捕捉療法) に代表される新しい放射線治療法により、以前に比べて局所再発なく経過する悪性グリオーマの症例が増えてきた。しかしながら腫瘍の局所制御がある程度可能になっても、最終的に髄液播種により新たな病変が出現して治療を非常に困難にしている。播種病変をいかに制御するかは、グリオーマ治療に携わる脳神経外科医にとって今後の重要な課題であると言える。
- (2) 近年の研究結果により、グリオーマの悪性化の過程において様々な遺伝子異常が関与していることが解明されている。多くの細胞においてがん抑制遺伝子である PTEN は、グリオーマ細胞において欠落しており、その結果 PTEN により本来抑制されている PI3-kinase/Akt pathway が細胞膜上に存在する EGFR (上皮成長因子受容体) を介して活性化されている。EGFR 遺伝子の増幅はグリオーマ細胞内で多くみられており、この経路の活性化により腫瘍増殖は促進される。またグリオーマの悪性化の過程において、血管新生の亢進も深く関与している事が知られている。とりわけ血管新生促進因子である VEGF (血管内皮成長因子) は、グリオーマ細胞内で発現が亢進しており、EGFR を介する経路に加えてグリオーマの腫瘍進行に重要な役割を担っていると思われる。現在、新たなグリオーマ治療法としてこれら

遺伝子を標的とした分子標的治療薬が注目されている。本邦においても、初発、再発悪性グリオーマの治療に対して VEGF 阻害剤である bevacizumab (Avastin®) が2013年6月に認可された。また、再発非小細胞肺癌の治療薬として本邦で使用されている EGFR 阻害剤である Gefitinib (Iressa®) は、研究レベルにおいて一定の腫瘍抑制効果が報告されている。しかしながら、臨床現場においてこれら薬剤の投与が明らかな予後の改善には未だ結びついておらず、その効果についても議論の余地が多い。bevacizumab に関しては、血管透過性を制御することにより造影剤投与後の腫瘍陰影が消失するが、かえって浸潤能を増強させているとの意見もみられる。グリオーマの腫瘍進行は、様々な遺伝子異常が関与しており、一つの遺伝子を標的とした治療法で効果を得るのは困難である。とくに播種病変の発生機序には腫瘍の血管増生、浸潤、増殖が深く関与しており、播種病変を制御するには複数の主要遺伝子を標的とする必要があると思われる。

2. 研究の目的

- (1) 今回我々は、AstraZeneca 社より EGFR/VEGF dual inhibitor である Vandetanib の原粉末の提供を受けて、予備実験を施行した。まず *in vitro* study において Vandetanib の増殖能、浸潤能の抑制効果とアポトーシス誘導に関して EGFR 阻害剤である Gefitinib とラット C6 グリオーマ細胞を使用して比較検討した。
- (2) Vandetanib は Gefitinib と比べて MTT assay, Cell invasion assay や apoptosis assay などの結果より、*in vitro* study において明らかに腫瘍増殖能の抑制やアポトーシス誘導がみられた (data not shown)。これらの予備実験の結果より、Vandetanib のグリオーマ細胞における腫瘍抑制に関与する経路の詳細な調査と、我々が確立したラットグリオーマ播種モデルを使用しての *in vivo* での播種病変抑制効果の検討を行うことにした。今回の研究を通じて播種病変の機序解明や Vandetanib による播種病変の制御効果を動物実験モデルで証明できれば、臨床現場での応

用が将来可能になると思われ、グリオーマ患者の生命予後を改善する橋渡し研究になるものと考えている。

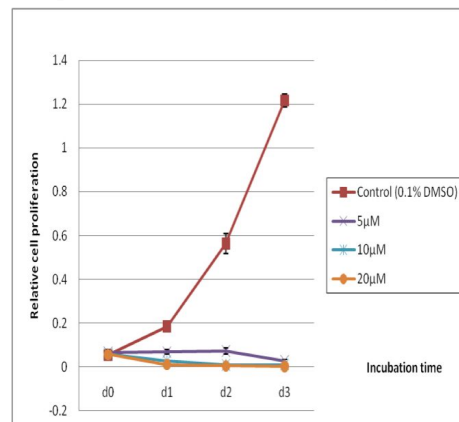
3. 研究の方法

- (1) まず Vandetanib と VEGFR-2 阻害剤投与による腫瘍増殖、浸潤と血管新生抑制効果の *in vitro* study での比較検討を行う。Vandetanib は癌細胞において EGFR を阻害する他に、上皮細胞において主に VEGFR-2 を阻害することが知られている。Vandetanib と VEGFR-2 阻害剤を C6 グリオーマ細胞に投与し、腫瘍増殖能、浸潤能、血管新生能の抑制効果とアポトーシス誘導効果について Assay kit を使用して比較検討する。特に浸潤能に関しては VEGF 阻害剤である bevacizumab (Avastin®) では血管新生を強く抑制するが、かえって浸潤能を増大させるという報告があり、浸潤抑制効果の比較において VEGFR-2 阻害剤と差がみられるか注視する。
- (2) Vandetanib は癌細胞と上皮細胞の細胞膜上で EGFR と VEGF を阻害し、その後細胞内で PI3-k/Akt pathway や MAPK pathway を阻害して腫瘍増殖能や浸潤能、血管新生能を抑制する事が知られている。今回、3 剤 (Vandetanib, Gefitinib, VEGFR-2 阻害剤) を C6 グリオーマ細胞に投与し、p-EGFR, p-VEGFR-2 (FLK-1) の抑制効果やその下流の pathway の変化を Western blot 法などで検討する。
- (3) 申請者らは Wister rat の大動脈弓より C6 グリオーマ細胞を注入することにより、髄液播種に近似した組織像を呈するモデルを確立させた (Wasita et al. Neurol Res. 2009)。腫瘍は脳室周囲一帯や脳の leptomeningeal region に多数病巣を形成し、組織像においても典型的な偽柵状配列像を呈した。このラット播種モデルを使用して、*in vivo* における播種制御効果を検討する。また sacrifice して摘出した脳の腫瘍の拡がりを H-E 染色で評価し、EGFR や VEGF などの免疫組織染色も行い、その発現の変化を評価する。また申請者らはステンレス製マイクロシリンジを使用して定位的に脳内に移植するモデルを確立している (Sho A et al. Neurol

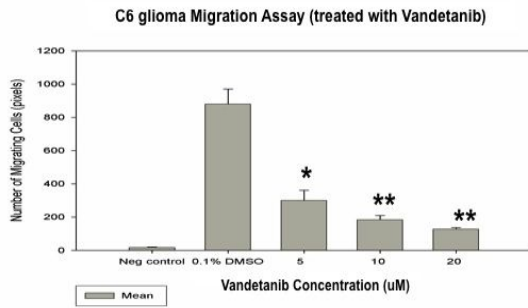
Res. 2007)。播種モデルと同じ条件で同様に評価し、*in vivo* での増殖抑制効果についても検討する。

4. 研究成果

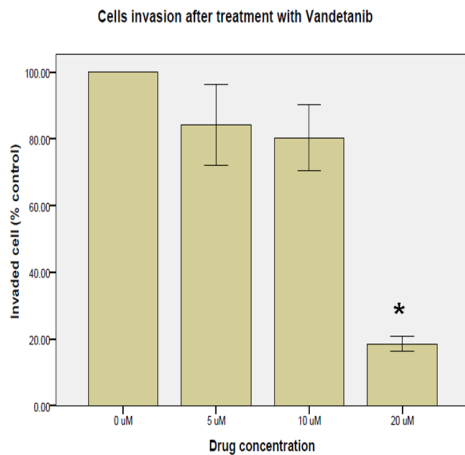
- (1) Vandetanib を C6 グリオーマ細胞に投与して細胞増殖抑制効果を MTT assay で検討した。96-well plate に 1×10^3 個/well の両細胞を撒いて 70% confluence になるまで 10% FBS 含有標準培養液で成長させた。その後薬剤を投与し、無血清培養液下で 72 時間後に増殖能を測定した。Vandetanib (0, 5, 10, 20 μ M) を投与後に day 4 まで incubation を行った。予備実験と同様に 5 μ M の濃度下で day 3 にて有意に C6 グリオーマ細胞の増殖を抑制した (Fig. 1)。次に Cell Migration assay を行った。96-well plate に 25,000 個/well の両細胞を撒いて細胞の接着を促すために 16 時間同様の培養液で成長させた。その後薬剤を投与し、無血清培養液下に 72 時間後に Wright-Giemsa 染色で評価した。Vandetanib は MTT assay 同様に 5 μ M で有意に Cell Migration を抑制した (Fig. 2)。また、Cell Invasion & Detection Assay Kit (Platypus Technologies) を使用して浸潤能抑制効果を検討したところ、20 μ M 投与下にて 72 時間後に抑制効果が得られた (Fig. 3)。アポトーシス誘導効果に関しては、In situ apoptosis detection kit (Takara Bio.) と Caspase-3/7 Assay (Promega) を使用した。両 assay とも 20 μ M 投与下において、apoptosis index の上昇と caspase-3/7 活性化を認めた (Fig. 4)。



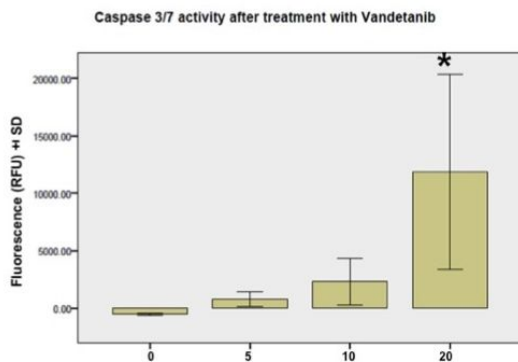
<Fig.1>



<Fig.2> *p<0.05 **p<0.01



<Fig.3> *p<0.05



<Fig.4> *p<0.05

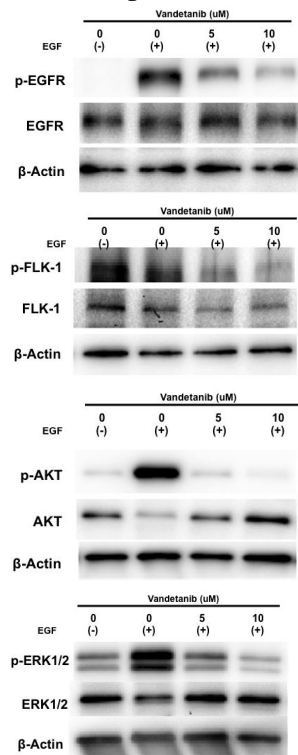
- (2) 昨年度C6グリオーマ細胞を使用して行ったMTT assay, Cell Migration assay, Cell Invasion & Detection Assay Kitによる実験を、ヒト膠芽腫細胞でも再現性があるか検討した。ヒト膠芽腫細胞株はT98G, U87MG, A172, U138MG, LN-18を使用した。前回と同じ条件で、Vandetanib(0,5,10,20 μ Mを投与後に

96-well plateにday 4まで培養を行った。MTT assayでは、すべての細胞株において5 μ M濃度下においても経時的に増殖能は抑制傾向が得られた。しかしながらday 3において優位差がみられたのはU87MGとA172のみで、T98G,U13 8MG, LN-18では優位差が得られなかった。Cell Migration assayやCell Invasion & Detection Assayにおいても同様の傾向がみられた。過去の文献よりU87MGとA172はMGMTが発現しておらず、残りの細胞株はMGMTが発現していると報告されている。また我々は過去にWestern blot法によってMGMTの発現が過去の報告と一致しているのを確認している。MGMTの発現レベルとVandetanibの反応性について何かしら関与がある可能性を示唆するが、その他のpathwayが関与している可能性も否定できなかった。

- (3) 今までの研究結果よりMGMT発現レベルとVandetanibの反応性について何かしら相関があるのではないかと疑われた。最初にヒト膠芽腫細胞株(T98G, U87MG, A172, U138MG, LN-18)におけるMGMT蛋白発現レベルを確認するためにWestern blot法にて既存のMGMT抗体を使用して検討した。過去の文献で報告があるように、U87MGとA172の両細胞株ではWestern blot法で明らかなMGMT蛋白の発現を認めなかった。一方残りの細胞株(T98G, U138MG, LN-18)では、多少発現に差が見られたがMGMT蛋白の発現を認めた。以前の研究結果より、MGMT発現株であるT98G, U138MG, LN-18においては、MTT assay, Cell Migration assayやCell Invasion & Detection Assayにて有意な抑制が得られなかった。MGMTとVandetanib抑制効果との関連性を調べるために、これら細胞株にMGMT siRNAをtransfectさせた。MGMT siRNAをtransfectさせると、すべての細胞株においてVandetanibによる反応性の改善がみられたが、有意とは言えなかった。次に、Vandetanibの効果とVEGF蛋白発現の差による影響を検討するために、これらヒト膠芽腫細胞株のVEGF,VEGFR-1,VEGFR-2の発現の差をWestern blot法で検討した。すべての細胞株においてこれらVEGFに関

連した蛋白発現の差はみられず、VEGF 発現の影響は考えにくいと思われた。

- (4) C6 グリオーマ細胞に Vandetanib や Gefitinib、VEGFR-2 阻害剤を投与して、その後の細胞内シグナルについて検討した。これら薬剤を投与すると、PI3-k/Akt pathway や MAPK pathway を介して腫瘍抑制効果が発揮される事が知られているが、p-EGFR,p-VEGFR-2(FLK-1)の発現の差を Western blot 法などで検討した。Gefitinib では 40ng/ml の rat recombinant EGF 刺激下で発現した p-EGFR, p-Akt や p-Erk1/2 を 5 μ M で有意に発現を抑制したが、p-FLK-1 は抑制しなかった。一方 VEGFR-2 阻害剤においては、p-FLK-1 の発現抑制効果はみられたが、p-EGFR,p-Akt や p-Erk1/2 は有意な抑制は得られなかった。Vandetanib は、p-EGFR,p-Akt や p-Erk1/2 は Gefitinib と同様に 5 μ M で有意な抑制効果が得られた。さらに p-FLK-1 においても 10 μ M で有意な発現抑制が得られた。以上より、Vandetanib は PI3-k/Akt pathway や MAPK pathway に関しては Gefitinib と同等の抑制効果が見られる以外に、VEGFR-2 も強力に抑制することが判明した(Fig.5)。



<Fig.5>

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

神部敦司 The effect of tumor suppression of C6 glioma cells by EGFR/VEGF inhibitor ZD6474. 9th AACR-JCA joint Conference, Breakthroughs in basic and translational cancer research. 2013年02月21日~2013 年02月25日 マウイ島、ハワイ、米国

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 高志 (WATANABE TAKASHI)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00175100

(2)研究分担者

神部 敦司 (KAMBE ATSUSHI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：70348283