

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670648

研究課題名(和文) In silico創薬手法による神経膠芽腫に対する新規MGMT特異的阻害剤の創製

研究課題名(英文) Discovery of specific inhibitor of MGMT against glioblastoma using in silico screening method

研究代表者

荒井 隆雄 (Arai, Takao)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40307400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫におけるO6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) geneの不活化は、temozolomide (TMZ) の有効性と関連しているため、MGMT阻害剤の開発により本疾患の予後改善が期待される。我々は、computational drug designによるin silico手法を用いて新規MGMT阻害剤の創製を行った。まず候補薬を化合物ライブラリーから複数抽出し、ヒトglioma cell lineを用いた抗腫瘍効果検証実験を行い、パパベリン塩酸塩を対象薬とした。そしてマウス皮下腫瘍モデル実験において対象薬の腫瘍増殖抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：An alkylating agent, temozolomide (TMZ), is a standard chemotherapeutic drug against malignant gliomas. Epigenetic silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter in tumor tissue from patients with malignant glioma is associated with improved survival after treatment with TMZ. A specific inhibitor of MGMT, therefore may improve prognosis of patients with malignant glioma. We extracted several MGMT inhibitory candidates from compound libraries by using an in silico screening method. Based on the results of a cell-based screening assay using a MGMT-positive human glioblastoma cell line "T98G", we selected a papaverine hydrochloride (PH) as an object for this study. The results of WST and colony formation assays indicated that PH had an antitumor effect against not only T98G but also a MGMT-negative cell line "U87MG". A study using a subcutaneous tumor model of nude mouse indicated that a PH had an antitumor effect against U87MG in vivo.

研究分野：脳神経外科

キーワード：in silico創薬 drug repositioning 神経膠芽腫 MGMT特異的阻害剤

1. 研究開始当初の背景

原発性脳腫瘍の中で最も悪性度の高い神経膠芽腫は、標準治療である手術・放射線治療・化学療法を組み合わせた集学的治療を行った場合でも、決して満足いく治療成績は得られておらず、未だ生命予後の極めて悪い悪性腫瘍である。Temozoromide (TMZ) は、神経膠芽腫に対して有効性が示された数少ない化学療法剤の一つであるが、これが誘導する DNA 傷害は O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) によって修復され、その抗腫瘍効果は減弱する。すなわち MGMT を腫瘍細胞内で特異的に阻害することができれば、TMZ による治療成績を向上させることができるものと考えられる。

2. 研究の目的

神経膠芽腫に対する新規治療薬の開発として、*in silico* 創薬手法を用いて MGMT 阻害候補化合物を化合物ライブラリーから探索・抽出し、drug repositioning (DR) 手法を用いて新規 MGMT 特異的阻害薬を短期間かつ低コストで創製することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞と細胞培養

本研究では、ヒト glioma cell lines T98G 細胞株及び U87MG 細胞株を用いた。T98G 細胞は、RPMI-1640 培地 (Wako, #189-02025)、U87MG 細胞は E-MEM 培地 (Wako, #051-07615) で細胞培養した。それぞれの培地には、10% ウシ胎児血清 (FBS, Biosera, #FB-1061/500)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Wako, #168-23191) を添加して使用した。

2) WST assay

各細胞を 96 well plate に 1×10^3 cells/well で播種し、24 時間後に対象薬を作用させた。さらに 72 時間後に Cell Counting Kit-8 (DOJINDO, #CK04) を 10 μ L/well で添加し

た後に、マイクロプレートリーダー infinite M200 (TECAN) を用いて、吸光度を測定した。

3) Colony formation assay

グリオーマ細胞を 6 well plate に 200 cells/well で播種し、24 時間後に対象薬を作用させた。10 日間培養後、4% 中性緩衝ホルマリンで細胞を固定し、0.01% (w/v) クリスタルバイオレットで染色を行った。風乾後、コロニー数を計数した。

4) Western blot

各培養細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、遠心 (260 \times g, 5 min, 4°C) し、細胞ペレットを得た。これに 10% β -メルカプトエタノール (Wako, #135-07522) 含有 laemmli サンプルバッファー (Bio-Rad, #1610737) を加え、100°C で 8 分間加熱した。氷上で 5 分間静置し、遠心 (15,000 \times g, 15min, 4°C) 後、上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した。12% ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad, Mini-PROTEAN TGX, #4561045) を用いて、細胞抽出液 (5 \times 10⁴ cells 相当/lane) を 200 V、35 分間、電気泳動をした。泳動終了後、セミドライ法による PVDF メンブレンへの転写を行った。転写後のメンブレンを室温で 1 時間、スキムミルク (wako, #190-12865) を用いたブロッキングを行い、一次抗体を 4°C で over night 後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。タンパク質検出には、Immobilon Western HRP Substrate Peroxide Solution (MILLIPORE, #WBKL-00-500) を用いて、ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) で行った。一次抗体は、anti-MGMT antibody (CST, #2739, 1:1000)、あるいは anti-GAPDH antibody (TREVIGEN, #2275-PC, 1:20,000) を用いた。二次抗体は、anti-rabbit IgG HRP-Linked Whole Ab Donkey (GE-Healthcare, #NA934, 1:20,000) を用いた。

4) MGMT 阻害剤候補薬の選択

In silico 創薬手法を用いて MGMT 阻害候補

化合物を化合物ライブラリーから探索・抽出した。まず MGMT 活性中心に結合能を有する阻害剤候補化合物を docking study により選択した。また、既存 MGMT 阻害剤である lomeguatrib (LOM) の構造を元に阻害剤候補化合物を選抜した。

5) MGMT 阻害効果の *in vitro* 解析

4) で選択した候補化合物群について、前記 glioma cell line の細胞を用いた WST assay および colony formation assay を行い、TMZ 単独、候補化合物単独、および TMZ と候補化合物との併用による効果を確認した。更に、最も高い効果を有した化合物において T98G 細胞を用いた解析を行い、化合物単独および TMZ 併用での細胞増殖抑制効果を確認した。

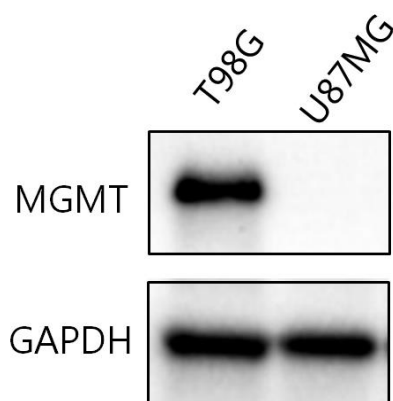
6) 皮下腫瘍モデルマウスによる *in vivo* 解析

1×10^5 個の U87MG をヌードマウス皮下に移植しこれを Day0 とした。Day11 より候補化合物を 40mg/kg \times 2 回/day \times 4 日間腹腔内に投与し、マウスの体重および腫瘍径から算出した腫瘍体積を比較した。

4. 研究成果

1) Western blot 法による MGMT 発現解析

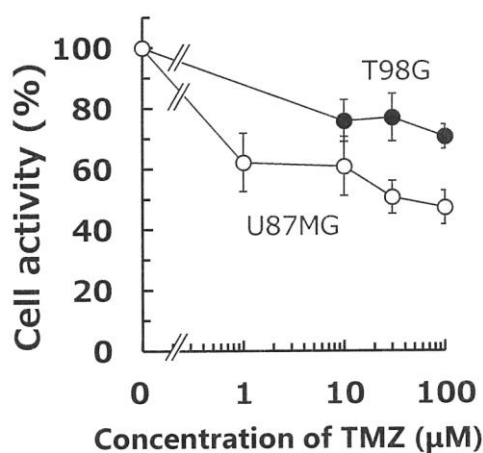
T98G 及び U87MG における MGMT 発現レベルを Western blot 法により解析したところ、T98G で高発現していた。U87MG では発現が確認されなかった< Fig. 1 >。



< Fig. 1 >

2) WST assay による細胞増殖抑制効果解析

各細胞を 96 well plate に 10^3 cells/well で播種した後、TMZ で処理し、72 時間培養後の細胞の代謝活性 (WST assay) により TMZ による細胞増殖抑制効果を求めた。この実験では、MGMT+ の T98G に比べて MGMT- の U87MG における TMZ の増殖抑制効果が高く、MGMT により TMZ の効果が減弱していることが示唆された< Fig. 2 >。



< Fig. 2 >

3) 既存 MGMT 阻害薬 LOM を用いた解析

Colony formation assay により、T98G 細胞に対して LOM を単独処理した結果、LOM を 0、0.001、0.01、0.1、1、10 μ M の各濃度で作用させても、細胞増殖抑制効果は認められず、LOM 単独処理では抗腫瘍効果を示さないことを確認した。

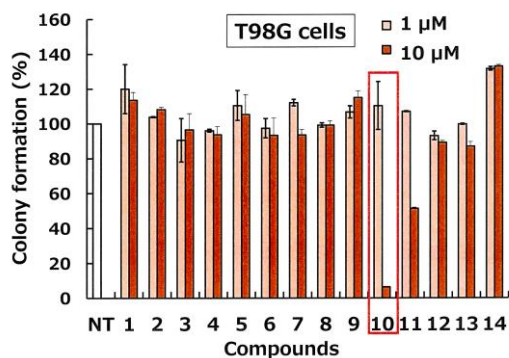
LOM 単独処理時 (0.01、0.1、1、10 μ M) の T98G における MGMT タンパク質レベルの変化を Western blot 法で調べたところ、単独処理では細胞増殖抑制効果を示さない濃度域において濃度依存的に MGMT タンパク質レベルが減少していた。

Colony formation assay にて、T98G 細胞に対する TMZ と LOM との併用効果を解析したところ、TMZ 200 μ M と LOM (0、0.001、0.01、0.1、1 μ M) を併用処理し、10 日間細胞培養したところ、TMZ と LOM 1 μ M との併用により、TMZ による細胞増殖抑制効果がコロニ

一形成能で、TMZ 単独処理時の 96%から 2%までに減少し、その併用効果は約 45 倍増加していた。この結果を元に、LOM を positive control とした MGMT 阻害候補化合物の cell-based screening assay として、この後の実験に本法を用いた。この研究成果は、論文発表 (慈恵医大誌: 131, 141-7, 2016) しており、本報告書におけるデータ提示は省略する。

4) Cell-based screening assay による MGMT 阻害候補化合物の解析

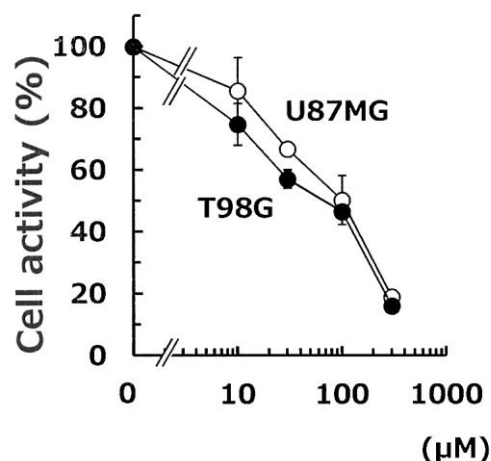
T98G細胞を6 well plateに200 cells/ wellで播種後、*in silico* screening にて抽出したMGMT 阻害候補化合物14種類 (No.1 ~ 14) で処理した。更に30分培養後TMZ [EC₂₀]で処理し、10日間培養後、コロニー数を測定し評価したところ、候補化合物No.10 (=パパベリン塩酸塩)において最も顕著な細胞増殖抑制効果を認め <Fig. 3A>、MGMT阻害効果を有する可能性のあるシード化合物として選出した。



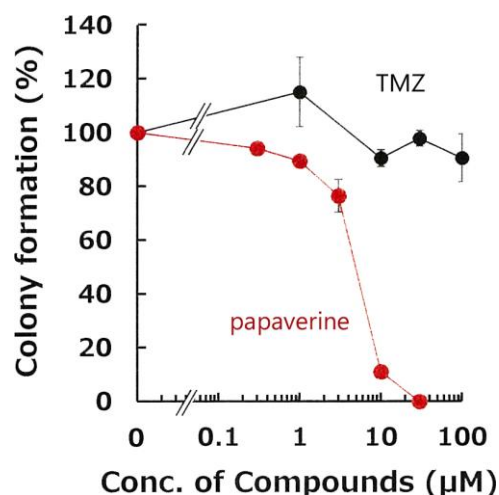
<Fig. 3A>

T98G もしくは U87MG に対するパパベリン塩酸塩単剤処理における増殖抑制効果の解析では、パパベリンがそれ単独で T98G 及び U87MG の両方に対して同程度の抗腫瘍効果を有することが確認された<Fig. 3B>。また、T98G を用いた colony formation assay においてパパベリンと TMZ とで比較したところ、パパベリン有意の細胞増殖抑制効果が確認された<Fig. 3C>。以上の結果から、パパベリンは MGMT 阻害剤としての効果も期待される一方、それ単剤で MGMT の発現に関

わらずグリオーマ細胞に対する増殖抑制効果を有する可能性が示唆された。



<Fig. 3B>

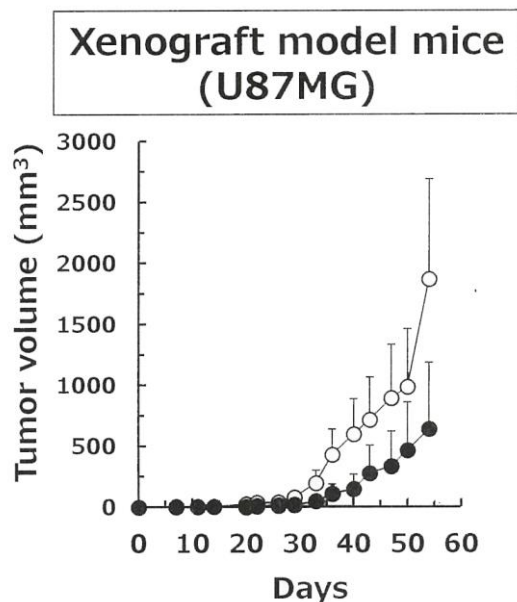


<Fig. 3C>

5) 皮下腫瘍モデルマウスによる検証

T98G 細胞の移植実験では腫瘍が生着せず、*in vivo* の検証が行えなかった。一方、U87MG 細胞は生着し、皮下腫瘍モデルとしてこれを用いた。皮下移植日を Day0 とし、Day11 よりパパベリン塩酸塩を 40mg/kg×2 回/day×4 日間腹腔内に投与した。パパベリン投与群の体重変化は、コントロール群と比較して有意な差はなく、有害性は確認されなかった。また、腫瘍径から算出した腫瘍体積の比較では、コントロール群 (○) に比べてパパベリン投与群 (●) において有意な腫瘍抑制効果

が確認された<Fig. 4>。



<Fig. 4>

以上の結果から、*in silico* 創薬手法及び drug repositioning (DR) 手法を用いて選択したパペリン塩酸塩は、それ単独もしくは TMZ との併用薬として神経膠芽腫に対する有効な治療薬になる可能性を有していると考えられた。

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 1 件)

Temozolomide 耐性神経膠芽腫に対して有効な併用化学療法を可能にする新規 MGMT 阻害剤スクリーニング系の構築. 新藤実香、佐藤聡、山本洋平、荒井隆雄、赤崎安晴、市村幸一、田沼靖一. *慈恵医大誌*, 131(5), 141-7, 2016.

[学会発表] (計 4 件)

1) Studies on the development of novel MGMT inhibitory drugs for TMZ-combination therapy against TMZ-resistant glioblastoma. Mika Shindo, Akira Sato, Yohei Yamamoto, Takao Arai, Yasuharu Akasaki, Koichi

Ichimura, Sei-ichi Tanuma. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 6-8, 2016, PACIFICO YOKOHAMA, Yokohama.

- 2) ヒト神経芽細胞腫に対する抗炎症性化合物 TLP-019 の制がん作用機序の解析. 小林杏輔、新藤実香、佐藤聡、吉森篤史、大山貴央、阿部英明、市村幸一、田沼靖一. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- 3) テモゾロミド耐性神経膠芽腫に対して有効な新規がん併用化学療法開発のための基盤研究. 荒井隆雄、新藤実香、佐藤聡、山本洋平、赤崎安晴、市村幸一、田沼靖一. 第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2016 年 12 月 4-6 日, 甲府富士屋ホテル, 甲府, 山梨
- 4) 経膠腫に有効な HMGB1/RAGE 相互作用を標的とする新規制がん剤の創製. 新藤実香、佐藤聡、小林杏輔、山本洋平、荒井隆雄、赤崎安晴、市村幸一、田沼靖一. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24 日-27 日, 仙台国際センター・東北大学川内地区, 仙台, 宮城

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: RAGE INHIBITOR

発明者: Sei-ichi Tanuma

権利者: 同上

種類: 特許

番号: WO2016/158810A1

出願年月日: 2016 年 3 月 26 日

国内外の別: 外国

取得年月日: 2016 年 10 月 6 日

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者：荒井隆雄 (ARAI TAKAO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40307400

(2) 研究分担者：田沼靖一 (TANUMA
SEI-ICHI)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：10142449

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者：なし