

研 究 報 告 書
平成29年度：A課題

令和 2 年 4 月 20 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 神戸大学バイオシグナル総合研究センター

住 所 神戸市灘区六甲台町 1-1

研究者氏名 上 山 健 彦



(研究課題)

新しい標的分子に着目した神経膠芽腫に対する新規治療薬開発への挑戦とその応用

平成30年 3月 9日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【目的】

神経膠芽腫（GBM）は脳腫瘍の中で最も悪性度が高い腫瘍で、生存期間中央値は1年～2年である。現在の治療薬は、アルキル化剤のテモゾロミドと抗VEGF抗体のベバシズマブの2剤であるが、有効性には限界があり、新たな治療法・薬の開発が切望されている。

我々は、2003年以降 Rho-family 低分子量 G 蛋白質の研究を行ってきたが、その点変異が種々の癌への形質転換や膠芽腫の浸潤に深く関わる Rac に着目した研究過程で、Rac により転写レベルで発現制御を受ける Rac シグナルの新規下流分子を同定し、グリーオシス（過度のアストロサイト増殖）を制御することを発見した。

本研究の目的は、我々発見した「Rac シグナルの新規下流分子」の発現低下を標的とした神経膠芽腫に対する新規治療薬を開発しようというものであり、実用性及び発展性を兼ね備えた世界最先端の研究である。

【方法】

①標的分子ノックアウト(KO)による抗脳腫瘍効果(脳腫瘍縮小)の確認

標的分子を高発現する GBM 由来である U87 細胞株を用い、ゲノム編集により、標的分子を KO した U87 安定細胞株を作製し、増殖能を調べる。標的分子 KO 及び野生型 U87 細胞の定位的移植により、ヌードマウスに脳腫瘍を形成させ（脳腫瘍移植モデル）、マウス生存期間延長が見られるか、腫瘍の縮小がみられるかを観察する。

②EGFP 標識 GSPT1 発現細胞を用いた化合物スクリーニング

上記の標的分子 KO U87 安定細胞株に、EGFP 標識標的分子を過剰発現する U87 安定細胞株（U87_KO:EGFP）を作製する。GFP 蛍光を指標に U87_KO:EGFP 細胞の EGFP 標識標的分子発現を低下させる化合物を、蛍光プレートリーダーを用いてスクリーニングする。スクリーニングには、東京大学から分与された化合物ライブラリー（5万化合物）及び富山大学和漢医薬学研究所から分与の生薬・漢方ライブラリー（162種）を用いる。

③脳腫瘍移植モデルを用いたスクリーニング化合物の効果判定

野生型 U87 細胞の移植により脳腫瘍を形成させたヌードマウスへ、上記で選定したシード化合物を投与し、マウスの生存期間と移植後1か月後の腫瘍体積の計測により、シード化合物の抗腫瘍効果を判定する。効果のあった化合物は、構造展開を行い、代謝安定性を含めたより良いリード化合物として創出する。

【結果】

①標的分子ノックアウト(KO)による抗脳腫瘍効果(脳腫瘍縮小)の確認

標的分子を KO した U87 安定細胞株は、野生型に比し著明な増殖能低下を示した。標的分子を KO した U87 安定細胞株の定位的移植を受けたにヌードマウスは、野生型マウスに比し、明らかな生存期間延長を認めた。

②EGFP 標識標的分子発現細胞を用いた化合物スクリーニング

東京大学からの化合物ライブラリー（約1.5万化合物）及び富山大学和漢医薬学研究所からの生薬・漢方ライブラリー（162種）と U87_KO:EGFP 細胞を用いて、EGFP 標識標的分子発現を低下させる化合物をスクリーニングした。今までに、東京大学からの化合物ライブラリーから $33 + 10 = 43$ 化合物を候補化合物として選定したが、標的分子の発現量を50%以下にする化合物の同定には至っていない。一方、富山大学からの生薬・漢方ライブラリーから、標的分子の発現量を50%程度にする生薬エキスを同定し、その主要構成化合物でも

細胞増殖抑制効果を確認した（細胞レベル）。

③脳腫瘍移植モデルを用いたスクリーニング化合物の効果判定

野生型 U87 細胞の移植により脳腫瘍を形成させたヌードマウスへ、上記で選定した生薬の主要構成化合物を投与し、マウスの生存期間と投与後 1か月後の腫瘍体積の計測する実験を開始したところである。

【考察】

我々が発見した GBM における標的分子の発現量低下が、GBM 由来細胞株である U87 細胞の細胞増殖を著明に低下させることを、作製した標的分子 KO 細胞を用いることで、細胞と個体レベルで証明出来た。更に、標的分子の発現量低下を検知できるスクリーニング系を確立出来た。現状（終了した約 1.5 万化合物のスクリーニング）では、標的分子の発現量を 50% 以下にする化合物の同定は出来ていないが、今後も（一先ず 10 万化合物を目標に、最大で 3 万化合物）スクリーニングを地道に且つ着実に進めて行く予定である。良い化合物が選定出来れば、その作用機序を解明すると共に、個体レベルでの効果を調べ、必ずや GBM の新規治療薬開発という目的を達成したいと考えている。