HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	膠芽腫幹細胞を用いた創薬スクリーニング系の構築と新規抗腫瘍薬の同定に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	越前谷, すみれ
Description	配架番号：2507
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14044号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77865
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sumire_Echizenya_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士(医　学)　　氏 名　越前谷　すみれ

学 位 論 文 題 名

膠芽腫幹細胞を用いた創薬スクリーニング系の構築と新規抗腫瘍薬の同定に関する研究
(Studies on establishment of drug screening system using a glioblastoma-initiating cells and identification of novel antitumor drug)

[背景]　神経膠芽腫(Glioblastoma multiform: GBM, WHO grade IV)を始めとする脳腫瘍は、手術のみでの治療は困難であり放射線や化学療法の併用は不可欠である。しかしながらこれらの集学的治療を行っても、ここ数十年来は生存率の改善をみなかった。2009 年、第 2 世代経口アルキル化剤テモゾロミド(TMZ)の出現により有意にその生存率が向上したが、それでも中間生存期間は 15 か月に満たず再発する例も多い。また、近年、交流電場腫瘍治療システム(Tumor Treating Fields:TTF)が 5 年生存率、生存期間中央値を延長する有効な治療であることが示され、本邦でも 2018 年に承認され治療効果を発揮しているが、その使用・装着には身体的な制限を要したり、機器が高価であることなど課題もあるとされ現時点では標準治療とは言い難い。これら機器の更なる開発とともに、新規の治療標的の検索や薬剤耐性機序の解明が、依然として強く望まれているというのが現状である。

脳腫瘍含め、腫瘍は様々な細胞集団より構成され、その中には移植により腫瘍を形成することができる細胞や化学療法・放射線療法に抵抗性を有する細胞、高い浸潤能力のある細胞群があることが明らかにされている。グリオーマにもこれら性質を有する少数の細胞群、癌幹細胞が存在することが確認され、治療抵抗性に関与していると考えられており、真の治療標的として癌幹細胞が重要であると考える。我々は、脳腫瘍患者から摘出したグリオーマの組織を無血清培地で培養し、浮遊細胞塊を形成する細胞群を免疫不全マウスの脳へ移植することで脳腫瘍を形成する細胞を、グリオーマ幹細胞 (Glioma-Initiating　cells: GIC)株として樹立することができた。これら樹立した複数の脳腫瘍株のうち最も腫瘍形成能の高かったのは GBM 由来の細胞株で、マウスの脳への移植後 3-4 週で腫瘍を形成するものであった。これら GBM 由来の GIC に TMZ 曝露を行うと多くの細胞が数日のうちに死んだが、極少数の細胞が生存し再度増殖を行い、耐性を有する細胞が存在する事が確認された。これらの細胞は、GBM 患者において推奨されている TMZ の血漿中濃度、即ち 50 μ M を優に超える濃度である 1000 μ M における培養下でも生存、増殖が認められた。我々は、これらの細胞を TMZ 曝露下で培養・維持を行う事で耐性株(TMZ-ResistantGICs:GICR)として精製・樹立し、性状解析を行ってきた。これら GICR では、元の野生株(GIC)よりも Side Population (SP) 細胞が増加しており、神経幹細胞及び GIC において認められる遺伝子の発現量にも差が認められた。また、これらをマウス脳に移植すると野生株と同様に腫瘍を形成し、TMZ 投与下で野生

株よりも数日生存期間が短縮しTMZ治療抵抗性が示唆された。本研究では、これらTMZ耐性細胞を利用して、再発や治療抵抗性の要因となる細胞集団に対し抗癌効果があり、かつ正常細胞に対しては細胞毒性を示さない化合物の単離とその作用機構を解明する。そして有効な抗癌剤がほぼTMZに限られてしいるという状況を打破することを目指す。

[方法] 富士フイルム株式会社所有の化合物ライブラリーを利用したハイスループットスクリーニングを行い，TMZ耐性神経膠芽腫に対して細胞障害活性を示す化合物の同定を行った。10,560個の各々独立した化合物を使用して、細胞増殖抑制/細胞死誘導に基づいたスクリーニング法で選別した。リガンドフィッシング法と質量分析法を用いて、ヒット化合物10580の標的タンパク質としてDihydroorotate dehydrogenase（DHODH）を同定した。10580の効果については、*in vitro*で細胞増殖、細胞死、及び作用機構について解析し、GICを移植して腫瘍を形成させたマウスを用いて*in vivo*おける抗腫瘍効果についても解析を行った。

[結果] ハイスループットスクリーニング、構造解析を経てGICに細胞毒性を有し正常細胞に毒性が少なく生体内でも分解されにくい10580を同定した。10580はde novoピリミジン合成に不可欠な酵素であるDHODHと結合する阻害剤であり、DNA合成に必要なピリミジンヌクレオチドの合成を減少させることを明らかにした。10580存在下で培養したGICは細胞周期を停止し、アポトーシスが誘導された。また、10580をマウスに経口投与するとGICRを皮下に移植して形成させた腫瘍の成長を抑制することが示された。DHODHに対する阻害効果は従来DHODH阻害剤として知られていたBreqinerと同程度であった。10580は体内に形成された腫瘍に対しても*in vitro*実験で検証された結果と同様に細胞毒性を発揮することが確認され、更にその作用機構の解析では、GICにおいて神経幹細胞マーカーでありGBMの形成に関与しているとされる転写因子Sex determining region Y-box 2 (SOX2) の発現抑制やアポトーシスの誘導も起こすことを明らかにした。正常マウスへの薬剤投与により、体重減少や活動性の低下、外表面上の変化などの薬剤有害事象のないことを確認した。GICにおけるSOX2 の発現を解析すると、10580投与により核の局在が減少した。転写因子の研究からO-GlcNAcyl化が核局在に関連があると考えられたため、GICにおけるUDP-GlcNAcと10580の関係が解析された。代謝解析からGICは、10580存在下ではUDP-GlcNAcの合成量が減少することがわかった。更に、10580存在下でGICにUDP-GlcNAcを加えるとSOX2はO-GlcNAcyl化され核内に留まり、且つ細胞毒性が軽減されることが確認された。以上の結果から、10580はSOX2のO-GlcNAcyl化を阻害し、核外輸送を促進することと新規ピリミジン合成を阻害することによりGICによる腫瘍形成を抑制することが明らかになった。

[結論] 本研究により、GIC/GICRに対する有効な新薬として10580を特定した。正常組織の細胞、特に脳細胞はピリミジン合成にサルベージ経路を使用する傾向があることを考慮すると、SOX2の核外輸送を促進させ、de novoピリミジン合成経路を阻害する10580は血液脳関門を通過させることが可能であれば、最小限の副作用で膠芽腫治療として有効であることが示唆された。