



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14044
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77866
Type	doctoral thesis
File Information	Sumire_Echizenya.pdf



学 位 論 文

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

越前谷 すみれ

学 位 論 文

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

越前谷 すみれ

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	8 頁
第一章 TMZ 耐性 GIC 株を殺傷する新規化合物のスクリーニングと標的因子の同定	
緒言	10 頁
方法	10 頁
結果	12 頁
考察	16 頁
第二章 DHODH 阻害剤候補化合物の GIC/GICR に対する効果と作用機構の解析	
緒言	17 頁
方法	17 頁
結果	20 頁
考察	30 頁
第三章 <i>In vivo</i> における GIC/GICR 由来の腫瘍に対する 10580 の効果	

緒言	31 頁
方法	31 頁
結果	32 頁
考察	34 頁
第四章 10580 の SOX2 を介した細胞毒性の分子メカニズムの 解析	
緒言	36 頁
方法	37 頁
結果	38 頁
考察	46 頁
考察	47 頁
謝辞	51 頁
利益相反	52 頁
引用文献	53 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の英文雑誌にオンライン公開された。

1. Smile Echizenya, Yukiko Ishii, Satoshi Kitazawa, Tadashi Tanaka, Shun Matsuda, Eriko Watanabe, Masao Umekawa, Shunsuke Terasaka, Kiyohiro Houkin, Tomohisa Hatta, Tohru Natsume, Yoshimasa Maeda, Shin-ichi Watanabe, Shinji Hagiwara, Toru Kondo

• Discovery of a new pyrimidine synthesis inhibitor eradicating glioblastoma-initiating cells. *Neuro-oncology*, 10 September, 2019 (online published)

2. Yoshihiro Tsukamoto, Naoki Ohtsu, Smile Echizenya, Satoko Otsuguro, Ryosuke Ogura, Manabu Natsumeda, Mizuho Isogawa, Hiroshi Aoki, Satoshi Ichikawa, Masahiro Sakaitani, Akira Matsuda, Katsumi Maenaka, Yukihiro Fujii, Toru Kondo

• Chemical Screening Identifies EUrd as a Novel Inhibitor Against Temozolomide-Resistant Glioblastoma-Initiating Cells. *Stem Cells*, 34(8):2016-251

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Smile Echizenya, Austin Sicong Jin, and Toru Kondo.

• Investigation of candidate genes that are prominently expressed in the TMZ-resistant glioblastoma-initiating cells, and their characterization.

3rd World Congress on Cancer Biology and Immunology. Milan, Italy, 11-12 March, 2019.

2. Yukiko Ishii, Smile Echizenya, Satoshi Kitazawa, Tadashi Tanaka, Shin-ichi Watanabe, Shinji Hagiwara, Toru Kondo.

• Chemical screening-based discovery of new drug against glioblastoma-initiating cells.

International Symposium of Advances in Cancer Stem Cell Therapeutics. Zhengzhou, China, 24-25 August, 2019.

3. Yukiko Ishii, Smile Echizenya, Satoshi Kitazawa, Tadashi Tanaka, Shin-ichi Watanabe, Shinji Hagiwara, Toru Kondo.

- Chemical screening-based discovery of new drug against glioblastoma-initiating cells.

24th World Congress on Advances in Oncology and 24th International Symposium on Molecular Medicine. Sparta, Greece, 10–12 October, 2019.

要旨

【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。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 $50 \mu\text{M}$ を優に超える濃度である $1000 \mu\text{M}$ 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-Resistant GICs: 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。

略語表

AMP : Adenosine triphosphate
ADP : Adenosine diphosphate
ATP : Adenosine triphosphate
bFGF : basic fibroblast growth factor
BSA : bovine serum albumin
CIC : cancer-initiating cell
CSC : cancer stem cell
CMP : Cytidine monophosphate
CDP : Cytidine diphosphate
CTP : Cytidine triphosphate
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
dATP : deoxyAdenosine triphosphate
dGTP : deoxyGuanosine triphosphate
dCTP : deoxyCytidine triphosphate
dTTP : deoxythymidine triphosphate
DHODH : dihydroorotate dehydrogenase
DMEM : Dulbecco' s modified Eagle' s medium
EGF : epidermal growth factor
EGFR : epidermal growth factor receptor
EGFP : enhanced green fluorescent protein
FCS : fetal calf serum
GC : Galactocerebroside
GMP : Guanosine monophosphate
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
GBM : glioblastoma multiforme
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GIC : glioma-initiating cell
GICR : glioma-initiating cell resistant to Temozolomide
HIF1: Hypoxia Inducible Factor
LGG : low grade glioma
NSC : neural stem cell

OGT : O-GlcNAc transferase
O-GlcNAc: O-linked N-acetylglucosamine
OSMI-1 : OGT with a small molecule inhibitor-1
PEG : polyethylene glycol
PBS : phosphate buffered saline
PFA : paraformaldehyde
shRNA : short hairpin RNA
SOX2 : (sex determining region Y)-box 2
TMZ : Temozolomide
UCKs : Uridine-Cytidine Kinase
UMP : Uridine monophosphate
UTP : Uridine triphosphate
UDP : Uridine diphosphate
UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acetylglucosamine

緒言

神経膠腫 (Glioma、グリオーマ) とは神経膠細胞 (glia cell) 由来の腫瘍であり、本邦においては原発性脳腫瘍の 27%を超え最も頻度の高い腫瘍の一つである (The Committee of Brain Tumor Registry of Japan. Report of brain tumor registry of Japan (2005-2008), 2017)。グリオーマは組織形態学的及び分子遺伝学的所見に基づき分類され、その各腫瘍型に対して生物学的悪性度 (良性～悪性) に応じた 4 段階のグレードが付与されており、グレードIVは未治療であった場合にその予後が最も不良である。

神経膠芽腫 (Glioblastoma multiforme: GBM, WHO grade IV) は WHO グレード IV に属し、成人の大半に好発し、高度な周囲浮腫を伴いながら急速に脳実質を破壊しながら浸潤・増殖し、1.5～2 年の経過で患者を腫瘍死に至らしめる腫瘍である。

分子生物学的には、グリオーマはその発生過程において特異的な遺伝子変異が数多く認められている。特に GBM においては IDH1 変異を伴う IDH 変異型 GBM、伴わない IDH 野生型 GBM に分類される。野生型 GBM の大半は高齢患者に発症し、予後不良で前駆病変なく発生する、従来一次性 GBM (primary GBM) と呼ばれたものに対応する。一方、変異型 GBM は一般的に若年成人に見られ、既存星細胞腫 (WHO grade II または III) が進行して発生する二次性 GBM (secondary GBM) が多く含まれる。上記の如く分子遺伝学的変化を予後予測に有用し治療方針の決定の補助を行っている。

神経膠芽腫を始めとする悪性脳腫瘍は、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。2006 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 (Stupp et al., 2009; Stupp et al., 2005)。未だ根治には程遠い現状であり、新規の治療標的の探索や薬剤耐性機序の解明が強く望まれている。

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があることが明らかになった。グリオーマにもこれら性質を有する少数の細胞群、癌幹細胞が正常組織幹細胞と同じくニッチ (微小環境) 内で守られて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、癌幹細胞を真の治療標的にすることが重要である (Blough et al., 2010; Kondo, 2006; Lathia et al.,

2015; Singh et al., 2004; Vescovi et al., 2006)。

北海道大学遺伝子病制御研究所・幹細胞生物学教室では、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ていた (Gupta et al., 2009; Mazzio et al., 2014; Yamashita et al., 2015)。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。他の癌幹細胞と同様に強い自己複製能を持ち、CD133 や CD15、Nestin、SOX2 といった神経幹細胞特異的タンパク質の発現も認められた。これら GBM 由来の GIC に TMZ 曝露を行うと数日で細胞の生存率は著しく低下したが、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。これらの細胞では、GBM 患者で推奨されている TMZ 血漿が $50 \mu\text{M}$ であるにも関わらず $1000 \mu\text{M}$ においても生存、増殖が認められた (Tsukamoto et al., 2016)。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-Resistant GICs: GICR) として樹立し、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 細胞が増加しており、高い薬剤排出能力や修復能力を有していることが考えられた。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、GICR をマウス脳に移植すると GIC と同様に腫瘍を形成し、TMZ 投与下で GIC 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、TMZ 耐性細胞に対しても抗癌効果があり、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 TMZ しか存在しない状況を打破することを目指す。

第一章 TMZ 耐性 GIC 株を殺傷する新規化合物のスクリーニングと標的因子の同定

【緒言】

GIC の特性を明らかにし、GIC 及び GICR を標的として殺傷する新薬を見つけることが求められている。しかし、過去の研究では GIC を培養しても均質な集団として正常に維持されないため、化合物スクリーニングによる新規化合物の同定には問題が有るのではないかと考えられていた。前述のとおり北海道大学遺伝子病制御研究所・幹細胞生物学教室では、GIC を標的とした治療を目標とするために、ヒト GBM 組織から分離し樹立したヒト GICs 濃縮細胞群樹立していた。さらに TMZ と共に培養することでさらに GIC を濃縮させた TMZ 耐性 GIC 株 (GICR) を樹立していた。そこで本章ではこれらの GIC 及び GICR を用いて小規模の化合物スクリーニングを行い GIC と GICR の両方を殺傷し、正常な神経系細胞には影響を与えない化合物の同定を試みた。また得られた化合物の標的タンパク質を同定し、作用機構を解析した。

【方法】

1) 細胞培養

化学物質と成長因子は、特に明記しない限り、それぞれ Invitrogen と PeproTech から購入した。GBM 細胞由来 GIC は 10%FCS を含む DMEM に 10%ペニシリン/ストレプトマイシンを混合した培地で培養した (通常培地)。NSC および GIC はサイトカイン bFGF (10ng/ml) と EGF (10ng/ml) を含む DMEM/F12 (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) で培養した (NSC 培地) (Hide et al., 2009; Tsukamoto et al., 2016)。オリゴデンドロサイトやニューロンへの分化を促す場合には 1%FCS を含む DMEM に 10%ペニシリン/ストレプトマイシンを混合した培地で培養した (分化培地)。

ここでヒト GBM 細胞由来 GIC は便宜的に E3GIC、E6GIC、及び E16GIC、TMZ 耐性株は E3GICR、E6GICR、及び E16GICR と呼称することとした。正常細胞として胎仔マウス由来神経幹細胞とマウス iPS 細胞由来のアストロサイト株 (iCell: FUJIFILM, Japan) を用いた

2) ケミカルライブラリースクリーニング

GICR で細胞周期停止または細胞死を誘発する化合物を特定するために、5 mM のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した 10,560 化合物を含む FUJIFILM ライブラリーを使用して化合物スクリーニングを実施した (Tsukamoto et al., 2016)。富士フイルムによって合成され、写真や印刷技術の構築で合成された還元剤や色素化合物などのいくつかのクラスの分子で構成されている。

3) MTT アッセイ

96 ウェルもしくは 384 ウェルプレートに細胞を播種し 3 日間培養した後、100 μ L の MTT (5 mg/mL; FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) を培地を除いた各ウェルに加えた。3 時間培養後、MTT 試薬を除き、100 μ L の DMSO を加えた。プレートリーダー (Benchmark, Bio-Rad, USA) で 570 nm の吸光度を測定した。

4) リガンドフィッシング法

ヒット化合物の結合タンパク質を特定するために、リンカーと FLAG エピトープ (ポジティブプローブ) でタグ付けされたベイト化合物を設計および合成した。非特異的相互作用因子を識別するための、ヒット化合物と似た構造の化合物をネガティブコントロールとした (Hayakawa et al., 2014)。

5) Liquid Chromatography (LC)-MS/MS Analysis

消化されたペプチドサンプルは、ナノスケール LC-MS/MS システムを使用して分析を行った。(Araki et al., 2016)。

6) DHODH 酵素アッセイ

Purified recombinant human DHODH (DHODH, 31-395aa, Human, His tag, E. coli) は ATGen (Catalog No. ATGP1615) から購入した。アッセイは 384 ウェルプレート形式で、100 mM Hepes, 400 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.05% TritonX-100, 0.175 μ g/mL DHODH, 0.2 mM CoQ, 0.1 mM DHO, 0.12 mM DCIP and 0.5% DMSO (pH 8.0) を含むバッファーを用いて室温で行った。BiomekNX を介して化合物を添加し、基質の添加により反応を開始した。酵素活性は、50 分間にわたって 600 nm での DCIP 吸光度の減少によって速度論的にモニターされた。試薬は Sigma-Aldrich と WAKO 純薬から購入した。吸光度は Envision plate-reading spectrophotometer で測定した。

【結果】

GICR の増殖を阻害及び殺傷する新しい化合物を特定するために、化合物スクリーニングを実施した（図 1）。

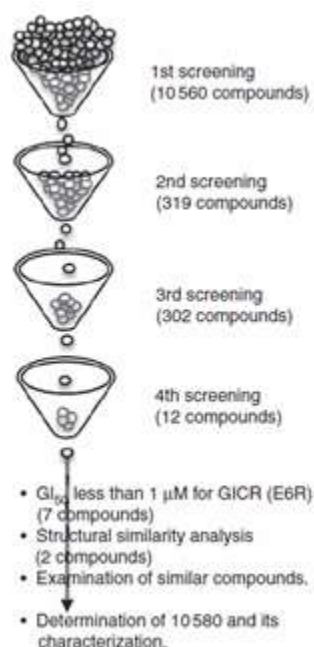


図 1 GICR に対する細胞毒性を持つ化合物スクリーニングのスキーム

1st スクリーニングでは、10,560 種類の化合物 10 μ M と共に E3GICR を 3 日間培養し、MTT アッセイにより細胞生存率を解析した（図 2）。DMSO をコントロールとしたとき E3GICR の生存率が 20%未満に低下させる 319 種類の化合物が選別された。

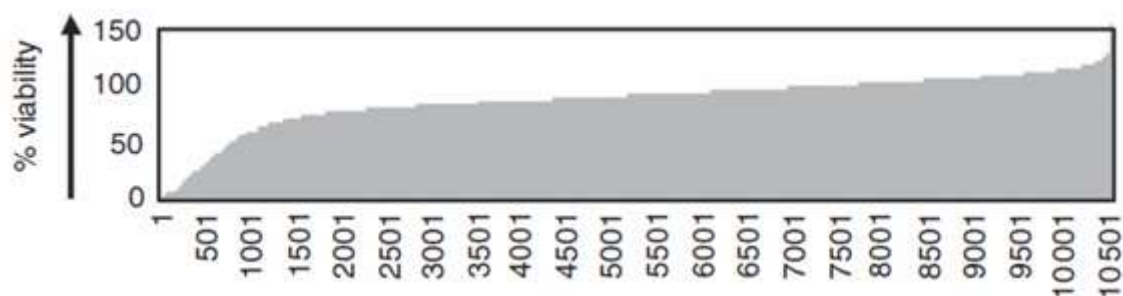


図 2 GICR の生存率が 20%未満に低下させる薬剤のスクリーニング 1st スクリーニング、10,560 化合物に対する E3GICR の生存率プロット。細胞生存率が 20%未満の 319 種類の化合物を選別。

2nd スクリーニングでは E3GIC 及び E6GIC、及び E3GICR 及び E6GICR と共に 319 種類の化合物を培養し、細胞毒性を解析することで、GIC および GICR の生存率を 50%未満に低下させる 302 種類の化合物が選択された (図 3)。

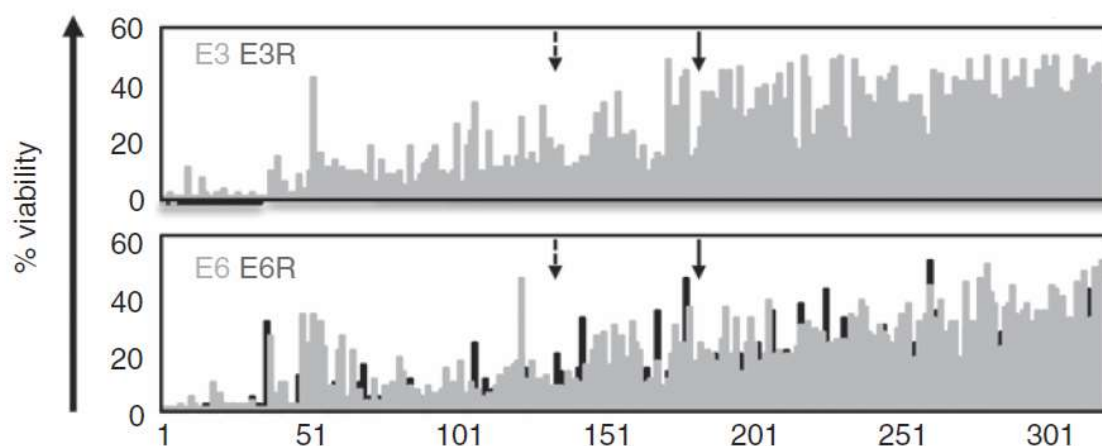


図 3 2 種類の GICR に対して生存率を 50%以下に低下させる化合物のスクリーニング E3GIC (上段、灰)、E3GICR (上段、黒)、E6GIC (下段、灰)、及び E6GICR (下段、黒) に対する 319 化合物の細胞毒性。GIC と GICR の両方の生存率を 50%未満に低下させた 302 種類の化合物を選別。

3rd スクリーニングでは正常細胞への影響を解析するために、胎児マウス由来 NSC およびマウス iPS 細胞由来のアストロサイトに対する細胞毒性を解析した (図 4)。

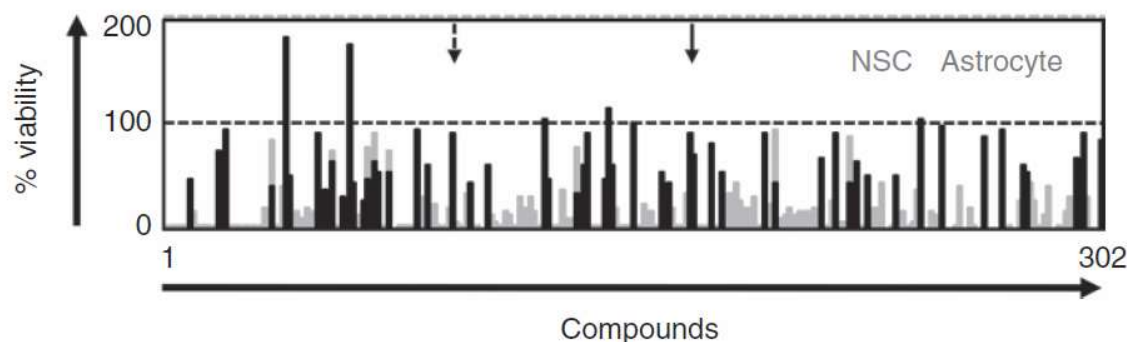


図 4 正常細胞に影響を与えない化合物のスクリーニング NSC (黒) 及びアストロサイト (灰) に対する 302 種類の化合物の細胞毒性。9700 (破線矢印) および 10607 (実線矢印) が GIC/GICR に対する GI_{50} 及び構造解析により候補化合物として選別された。

NSC とアストロサイトの両方の生存率が 75%を超えている化合物を同定し、次いで、4th スクリーニングとしては、50%増殖阻害濃度 (GI₅₀) を解析することで、E6GICR に対する GI₅₀ が 1 μ M 未満の化合物を選択した。特に、選択された化学物質は、カルボン酸骨格を持つ類似の構造を持っていた。これらのうち、9700 と 10607 の 2 つは構造的に非常に類似しており、GICs (E6GIC/E6GICR と E16GIC/E16GICR) の増殖を有意に抑制した (表 1)。これらの結果から 9700 と 10607 をヒット化合物候補とした。

表 1 候補化合物の 50%増殖抑制濃度 (GI₅₀) の測定

Compound	GI ₅₀ (μ M) of GICs/GICRs			
	E6	E6R	E16	E16R
9700	ND	0.78	ND	ND
10607	0.1	0.65	11.8	1.96

ND: not determined.

GICs/GICRs の増殖を 50%に減少させる 9700、10607 の濃度を測定。

9700 と 10607 の GIC/GICR に対する細胞傷害活性を MTT アッセイにより解析した (表 1)。候補化合物はそれぞれ GICs (E6GIC/E6GICR と E16GIC/E16GICR) に対する細胞毒活性を解析した。0.1 μ M から 100 μ M まで濃度を変えて 3 日間培養した。9700 より 10607 の方がより低濃度でも強い細胞毒性が認められたため、まず 10607 を候補として解析を行うことにした。

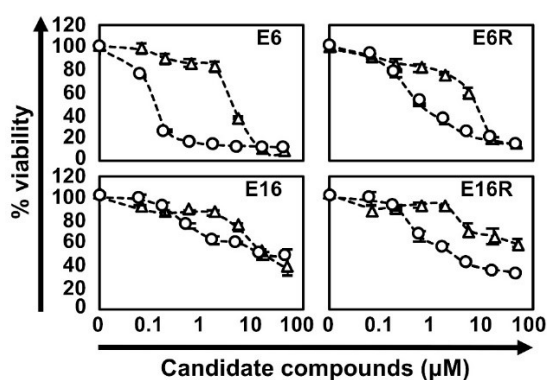


図 5 候補化合物 9700、10607 の GIC/GICR に対する細胞毒性 GIC (E6GIC、E16GIC) および GICR (E6GICR、E16GICR) に対する候補化合物 10607 (白丸)、9700 (白三角) の濃度依存的細胞毒性を解析。

次にリガンドフィッシング法を用いて 10607 の分子標的の検索を行った。リンカーとして polyethylene glycol (PEG) または C12 を用いて、FLAG エピトープ（ポジティブコントロールプローブ）でタグ付けされたベイト化合物を合成した。また非特異的に結合する化合物を除外するために、10607 に類似した構造を持つ化合物をネガティブコントロールとして用いた。細胞溶解物をポジティブコントロールプローブ及びネガティブコントロールプローブと共にインキュベートした後に、抗 FLAG 抗体を用いてアフィニティ精製を行いプローブ-タンパク質複合体を精製した。精製した複合体をタンパク質分解酵素である Endoproteinase Lys C 及び Trypsin で消化し、nano-flow LC-MS/MS を用いてペプチド混合物を直接分析した。また競合実験として FLAG リンカーを含まない 10607（ポジティブコントロールプローブよりも 100 倍高い濃度）とインキュベートして得られた精製物も分析した。FLAG でタグ付けされた 10607 と結合し、ネガティブコントロールプローブとは結合しないタンパク質から候補タンパク質を選択した（表 2）。

表 2 リガンドフィッシングによる 10607 結合タンパク質の検索

A. PEG linker

Protein Id	Description	Identified peptide number		
		Positive probe	Negative probe	Competition
DHODH	Dihydroorotate dehydrogenase (quinon), mitochondrial	1332.83247	ND	ND
DHRS1	dehydrogenase/reductase SDR family member 1	909.156864	ND	ND
COPS7B	COP9 signalosome complex subunit 7b	37.7918987	ND	ND
PPP4R2	Protein phosphatase 4, regulatory subunit 2	9.81190651	ND	ND

B. C12 linker

Protein Id	Description	Identified peptide number		
		Positive probe	Negative probe	Competition
DHODH	Dihydroorotate dehydrogenase (quinon), mitochondrial	1556.8505	ND	ND

ND: not determined.

PEG リンカー(A) もしくは C12 リンカー(B) を介して 10607 に特異的に結合する候補タンパク質を選択。

候補の中では、FLAG リンカーフリー10607 の存在下でポジティブコントロールプローブとの結合が認められないタンパク質として、Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)を候補とした (表 2)。

また、10607 および 9700 による DHODH 活性に対する影響を解析するために DHODH 酵素アッセイを行ったところ、10607 および 9700 の 50%活性阻害濃度 (IC_{50}) は、それぞれ 28.6nM、120.3nM であった。従来の DHODH 阻害剤として知られている Brequinar (BRQ) の IC_{50} は 11 nM であり 10607 と近い値であった。ChEMBL データベース (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>) で分子構造を比較したところ 10607 はカルボン酸骨格を持つ DHODH 阻害剤と 74.7%の類似性を持つことが明らかになった。

【考察】

ヒト GBM 組織から分離し樹立したヒト GICs 濃縮細胞群を樹立した。E6GIC 及び E16GIC、また TMZ とともに培養することでさらに GIC を濃縮させた細胞群、即ち、TMZ 耐性 GIC 株 E6GICR 及び E16GICR を用いてそれらに細胞毒性を有する化合物のスクリーニングを実施した。これにより GIC 及び GICR の両方を殺傷し、NSC や iPS 細胞由来のアストロサイトへの細胞毒性が低い化合物として 9700 及び 10670 が得られた。これら二つの化合物は構造的に非常に類似しており、細胞毒性に関する作用機構にも何らかの関連を有することが予想された。また、これらの細胞毒性には濃度依存性があったが、低濃度でも強い効果を持つのは 10670 であり、将来、薬剤を生体に用いる場合にはより低用量での使用が期待できる同化合物が第一候補として至適と考えられ、10607 を優先して更なる実験を進めた。10607 の作用機構を明らかにしてゆくために、まずリガンドフィッシング法を行い化合物に結合するタンパク質を解析したところ、10607 は再現性を持ってピリミジン合成酵素の一つである DHODH と結合する因子(標的因子)であることがわかった。また、分子構造からは DHODH 阻害剤として機能することが示唆され、9700 と比較すると細胞毒性同様、10607 の方がより低濃度で酵素阻害作用を有することが分かった。従って、10607 を優先的に候補化合物として解析を行うこととした。

第二章 DHODH 阻害剤候補化合物の GIC/GICR に対する効果 と作用機構の解析

【緒言】

第1章では GIC/GICR に対する細胞毒性を持つ化合物として 10607 が候補として選択された。選択された化合物に関しては類似化合物を含め、将来的に体内に投与することを前提としているため、生体内での安定性を解析することが必要であった。

また、前章では 10607 は DHODH を標的因子とし、構造解析からは DHODH 阻害剤と似た構造を持つ化合物であることもわかった。この標的とされる DHODH は、ピリミジン塩基を新規 (de novo) に生合成する過程において、ジヒドロオロト酸塩 (Dihydroorotate; DHO) からオロト酸塩が誘導されるときに触媒として働く酸化還元酵素である。GIC における DHODH の発現量や、DHODH の発現量が高い GBM 患者の予後から実際の GBM に対する影響を検討するとともに、GIC におけるヌクレオチド合成全体における影響を解析することで、ピリミジン合成に対する 10607 の効果を明らかにした。

GIC/GICR は通常の培養細胞同様に増殖する。そこで細胞増殖に対する DHODH 阻害剤候補化合物の影響を解析する。また GIC は神経幹細胞マーカーを発現し、組織再構築能をもつ組織幹細胞のように腫瘍を再形成させることが再発の原因の一つと考えられており、そこで分化マーカーの発現に対する効果を解析する。

【方法】

1) 薬物動態 血中濃度測定

候補化合物 (3 または 30 mg/kg) を BALB/c マウスに経口投与した (n=5)。化合物投与の 0.25、0.5、2、4、8、及び 24 時間後に血液を回収した。採取した血液サンプルを 4℃ 1,500 g で 10 分間遠心分離し、血漿を得た。血漿中の候補化合物の濃度は、ACQUITY UPLC (Waters, USA) および Triple Quad 5500 システム (AB SCIEX, USA) を用いた LC-MS/MS で測定した。液体クロマトグラフィーは、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (1.7 µm、2.1 mm×50 mm、Waters,

USA) を使用して、流速 0.6 mL/min で実施した。移動相は、5 mM 酢酸アンモニウム、5%アセトニトリル、および 0.2%ギ酸を含む蒸留水（移動相 A）および 5 mM 酢酸アンモニウム、5%アセトニトリル、および 0.2%ギ酸を含むアセトニトリル（移動相 B）で行った。分析は、ポジティブモードでのエレクトロスプレーイオン化によってイオン化され、モニタリングイオンは候補化合物で 370.1>350.1 であった。

2) メタボロームアッセイ

E6GIC および E16GIC は、培養液中でそれぞれ 1 μ M および 10 μ M の候補化合物で 24 時間処理された。細胞を 5%D-マンニトール (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) で洗浄し、代謝物を 70%氷冷メタノールで抽出して分析した。

3) Quantitative reverse-transcription PCR (qPCR)

RNeasy kit (Qiagen, Germany) を用いて NSC、GIC 及び GICR から RNA を抽出した。Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Germany) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作成した。定量 PCR には THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Japan) を反応試薬として用い、StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて解析を行った。PCR 反応条件は 95°C 15 秒、60°C 30 秒を 40 サイクルとした。発現量を 18S ribosomal RNA (rRNA) で標準化する $\Delta\Delta C_t$ 法で解析した。

DNA プライマー配列

human DHODH Forward (FW): 5' -GCCATAAATTCGAAATCCAG-3' Reverse (RV): 5' -ACAGCTTGGTCCTCAGGGAG-3'、UCK1 FW: 5' -TGTCTCGAAGAGTTCTCCGG-3' RV: 5' -TGCACGATCAGGTTGATGGC-3'、UCK2 FW: 5' -GACCTGTTCCAGATGAAGCTT-3' RV: 5' -GAATTCCTCAAAGGCAGGCTT-3'、18S rRNA FW: 5' -CGGACAGGATTGACAGATTG-3' RV: 5' -CAAATCGCTCCACCAACTAA-3'

4) 免疫染色

2%PFA 溶液を細胞に加えて室温で 5 分間固定した後、0.2%Triton X-100 を含む 10%BSA ブロッキング溶液で室温にて 30 分間の前処理を行い、一次抗体を室温にて 60 分間、二次抗体を室温にて 60 分間反応させた (Hide et al., 2009; Kondo and Raff, 2000)。核は DAPI (5 μ g/mL) で対比染色した。抗原を検出するために下記の抗体を使用した。

また BrdU アッセイは BrdU (20 μ M/medium) となるように調整した培養液で 37°C にて 6 日間培養後に免疫染色を行い複数視野での陽性細胞数を解析した。

一次抗体 ; mouse monoclonal anti-Nestin (1:200, BD Biosciences, USA), biotinylated goat polyclonal anti-human Sox2 (1:200, R&D, USA), mouse monoclonal anti-Glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:400, SIGMA, USA), mouse monoclonal anti- β III-tubulin (1:400, SIGMA, USA), mouse monoclonal anti-galactocerebroside (GC, 1:10, culture sup), rat monoclonal anti-GFP (1:500, Nacalai Tesque, Japan), rabbit polyclonal anti-active Caspase 3 (1:1000, Cell Signaling Technology, USA), rat Anti-BrdU antibody (1:500, Abcam, UK)

二次抗体: Alexa568-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500, Life Technologies, USA), Alexa488-conjugated goat anti-mouse, -rabbit, or -rat IgG (1:500, Life Technologies, USA), Streptoavidin-Cy3 (1:200, Thermo Fisher Scientific, USA), goat anti-mouse IgG-Cy3 (1:500, Jackson ImmunoResearch, USA).

5) ベクターコンストラクション

遺伝子組み換え実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に基づき行った。DHODH 遺伝子をノックダウンするために siRNA Wizard (InvivoGen, USA) にてヘアピン配列を作製して psiRNA-h7SKhygro G1 ベクター (InvivoGen, USA) に挿入した。

shRNA の標的配列

DHODH 5' -CCGGGATTTATCAACTCAAAC-3'

EGFP (コントロール) 5' -GCAAGCTGACCCTGAAGTTCA -3'

6) 形質転換

2x10⁶ 個の GIC または GICR とノックダウンベクター 10 μ g を NSC Nucleofector Solution 100 μ l 中に懸濁し、Nucleofector (AMAXA) (Lonza, Schweiz) デバイスにて形質導入した。細胞は適切な培養液中で培養し形質導入された細胞を 200 μ g/ml のハイグロマイシン B で選択した。

【結果】

生体内における候補化合物の安定性を解析した際、マウス肝ミクロソーム中において 10607 の安定性が低く、分解してしまうため、富士フィルムライブラリーの中で DHODH 阻害剤と同様の構造を持つ化合物を集めたライブラリーから再度スクリーニングを行い、肝臓で分解されにくい化合物を検索し直したところ、肝ミクロソームにおいて高い安定性を示す 10580 という化合物を新たに同定することができた。10607 と 10580 は 2-アミノ-5-シクロプロピルニコチン酸基とインドール基という類似構造を有し、この構造は従来の DHODH 阻害剤には存在しないということが分かった (図 6)。

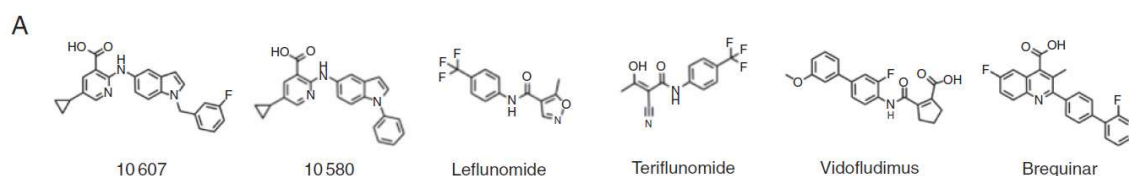


図 6 得られた候補化合物と従来の DHODH 阻害剤の分子構造

新規候補化合物とした 10580 (30mg/kg) の薬物動態プロファイルは、12230 (ng·h/mL) の濃度曲線下で十分な面積と、より長い血中半減期 ($T_{1/2} = 6.25$ h) を示した。30mg/kg 投与すると *in vivo* での有効性試験に必要な 24 時間の血中 GI_{50} の予測最大濃度 25.8 ng/mL を超える十分な濃度が維持された (図 7)。よって 10580 を用いれば *in vivo* での有効性を検証するための経口投与実験が可能と考えられた。

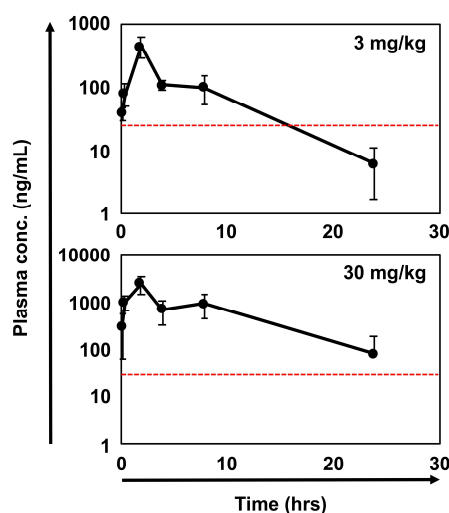


図 7 血中における 10580 の濃度 10580 (3 または 30mg/kg) を BALB/C マウスに経口投与した。化合物投与の 0.25、0.5、2、4、8、及び 24 時間後の血液を解析した。血漿中の 10580 の濃度は、LC-MS/MS によって決定された。赤い破線は GI_{50} (25.8 ng/ml) を示す。Error bar : $\pm$ SD

10580 に関しても GIC/GICR に対する細胞毒性を MTT アッセイで解析した (図 8)。9700、10607 と比較すると 10580 は 9700 の 56 倍、10607 の 47 倍の細胞毒性があることが認められた (表 3, 図 8)。

表 3 候補化合物の 50%増殖抑制濃度 (GI_{50}) の測定

Compound	GI_{50} (μ M) of GICs/GICRs			
	E6	E6R	E16	E16R
9700	ND	0.78	ND	ND
10607	0.1	0.65	11.8	1.96
10580	0.07	0.01	0.43	0.49

ND: not determined.

GICs/GICRs の増殖を 50%に減少させる 9700、10607、及び 10580 の濃度の測定。

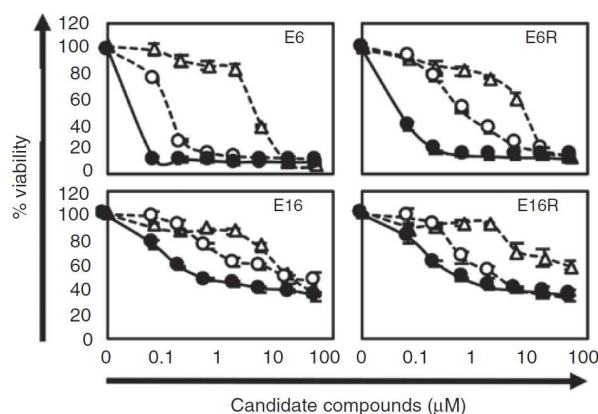


図 8 候補化合物 9700、10580、10607 の GIC/GICR に対する細胞毒性 GIC (E6GIC、E16GIC) および GICR (E6GICR、E16GICR) に対する候補化合物 10607 (白丸)、9700 (白三角)、及び 10580 (黒丸) の濃度依存的細胞毒性を解析、比較。

また GIC に対する 10580 の細胞毒性を既存の DHODH 阻害剤である teriflunomide、leflunomide、vidofludimus、及び BRQ と比較した。10580 は他の DHODH 阻害剤と比べて低い濃度で細胞毒性が示された (図 9)。したがって 10580 は、GIC/GICR に対して強い細胞毒性を持つ、DHODH 阻害剤であると考えられた。

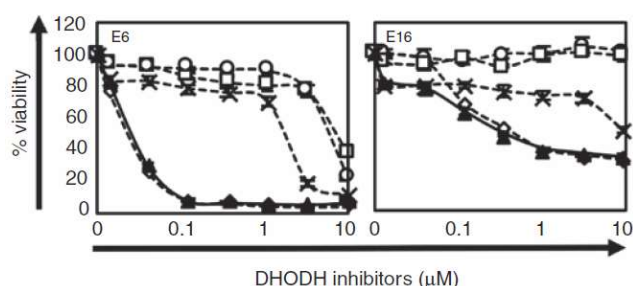


図 9 10580 と従来の DHODH 阻害剤の細胞毒性を比較 DHODH 阻害剤の teriflunomide (白丸)、leflunomide (白四角)、vidofludimus (十字)、BRQ (白菱形)、及び 10580 (黒三角) の GIC (E6GIC、E16GIC) に対する濃度依存的な細胞毒性。

10580 による DHODH の活性阻害メカニズムを解析するため、10580 処理した GIC におけるメタボローム解析を行い、ピリミジン合成 (de novo 経路) に使用されるジヒドロオロチン酸塩 (DHO)、オロチン酸塩、およびその下流代謝物の量を決定した (図 10)。

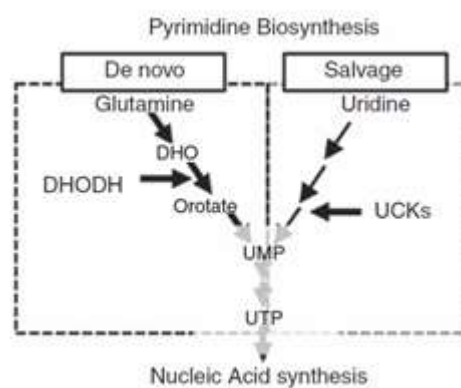


図 10 ピリミジン合成経路の模式図 ピリミジン生合成は de novo 経路 (左側) 及びサルベージ経路 (右側) の両方によって制御され、ウリジル酸 (ウリジナーリン酸: UMP) を中間体とする。de Novo ピリミジン合成経路ではグルタミンよりジヒドロオロチン酸 (DHO) が生成され、DHODH により脱水素されることでオロチン酸が生成され、次いで UMP が生成される。

サルベージ合成経路では、ウリジンがウリジン - シチジンキナーゼ (UCKs) によりリン酸化されることで UMP が生成され、更に UDP, UTP と変化し核酸合成が行われる。

DMSO を添加したコントロールと比較して 10580 を添加すると DHO レベルは E6GIC で 596 倍、E16GIC で 125 倍と大幅に増加した (図 11 左上)。オロチン酸塩 (Orotate) レベルは 10580 処理 E16GIC で減少したが、E6GIC については 10580 処理でわずかに増加した (図 11 右上)。またオロチン塩酸の下流代謝物である UMP は、10580 処理細胞において有意な減少が認められた。

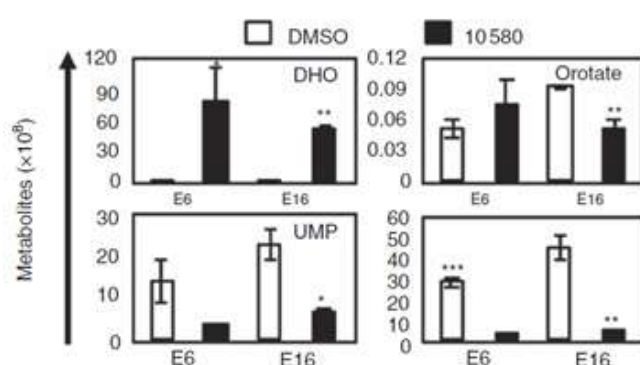


図 11 10580 が DHO-Orotate 代謝に与える影響 DMSO (白) もしくは 10580 (黒) と共に培養した GIC (E6GIC 及び E16G) における代謝物 (DHO、Orotate、UMP、及び UTP)。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

オロチン塩酸の下流代謝物である全てのピリミジンヌクレオチド (UMP、UDP、UTP、CMP、CDP、CTP、dCTP、および dTTP) のレベルについても 10580 に対する影響が解析された (図 12)。10580 処理 GIC において全てのピリミジンヌクレオチドにおいて有意な減少が認められた (図 12A, C)。プリンヌクレオチド (ATP、GTP、dATP、及び dGTP) については、減少は認められなかった。 (図 12B, C)。これらの結果から、10580 が DHODH 活性を阻害することにより de novo ピリミジン合成経路を妨げることが示唆された。

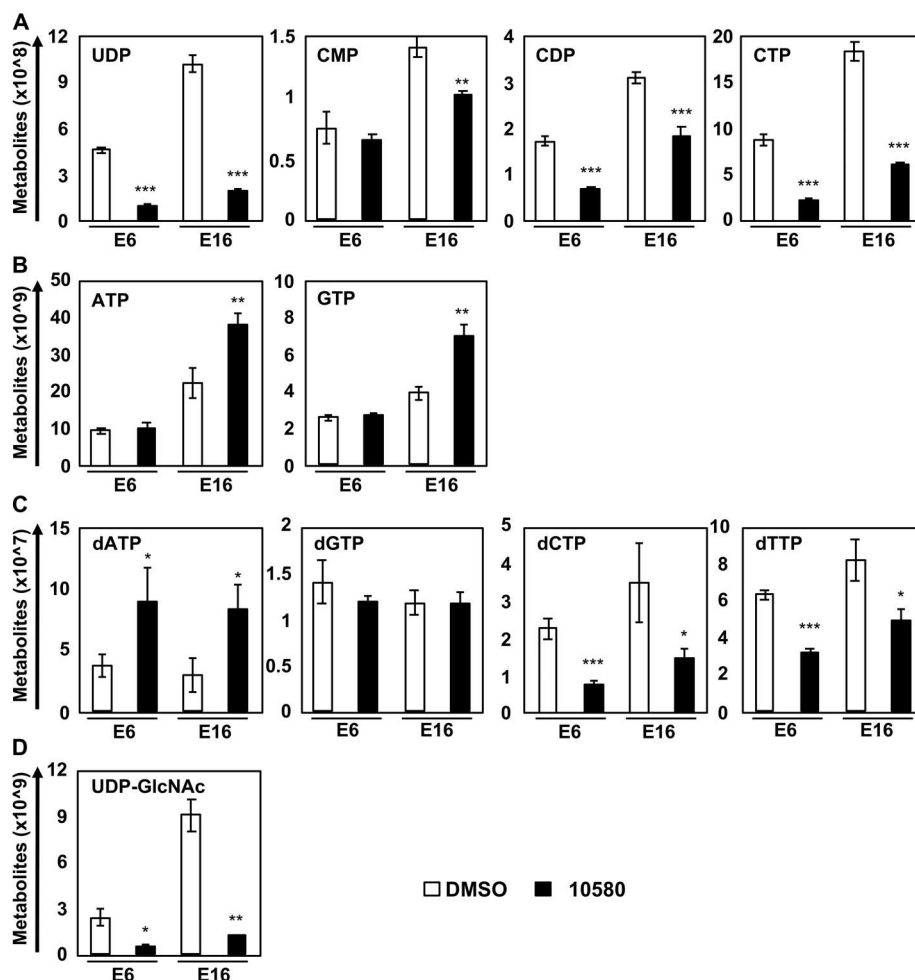


図 12 ヌクレオチド合成における 10580 の影響 DMSO(白) もしくは 10580 (黒) と共に培養した E6GIC 及び E16GIC におけるピリミジンリボヌクレオチド (A)、プリンリボヌクレオチド (B)、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (C)、及び UDP-GlcNAc (D) の合成レベル。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

ピリミジン合成は de novo 経路及びサルベージ経路の両方によって制御されるが (図 10)、ここまでの結果からは de Novo ピリミジン合成経路を阻害していると考えられる 10580 が GIC/GICR に対して強い細胞毒性を持つことが示されている。そこでサルベージ経路の主要な調節因子であるウリジン-シチジンキナーゼ (UCK) と DHODH の発現を NSC、GIC、および GICR について定量 PCR (qPCR) で解析した。DHODH と UCK の両方の発現量について、NSC と比較して GIC 及び GICR において有意に高い発現が認められた (図 13)。

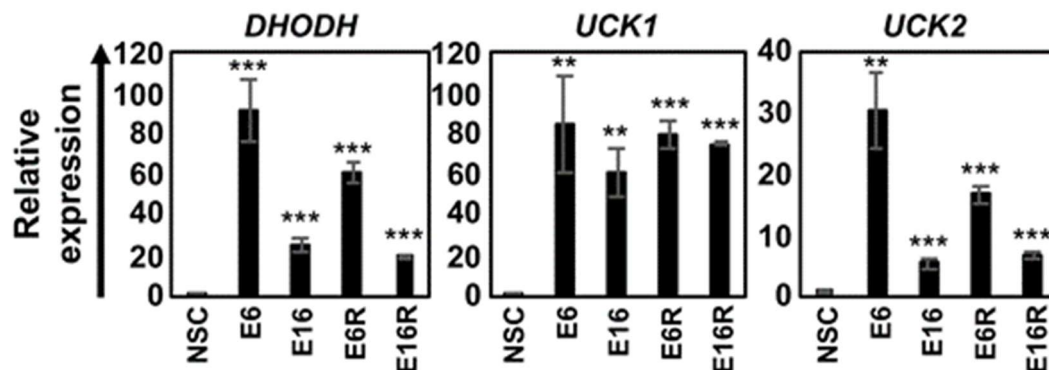


図 13 GIC/GICR における DHODH 及び UCKs mRNA の発現量 qPCR を用いて NSC、GICs (E6GIC and E16GIC)、及び GICRs (E6GICR and E16GICR) における DHODH、UCK1、及び UCK2 の発現量を解析した。GIC/GICR における発現量を NSC における発現量と比較し、相対値を示した。Error bar: $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

データベース Cancer Genome Atlas を用いて、Low-Grade Glioma (LGG) 及び GBM における DHODH、UCK1、及び UCK2 発現を解析すると、DHODH が LGG よりも GBM において強く発現し、UCK1 の発現が GBM では低いことが明らかになった (図 14)。

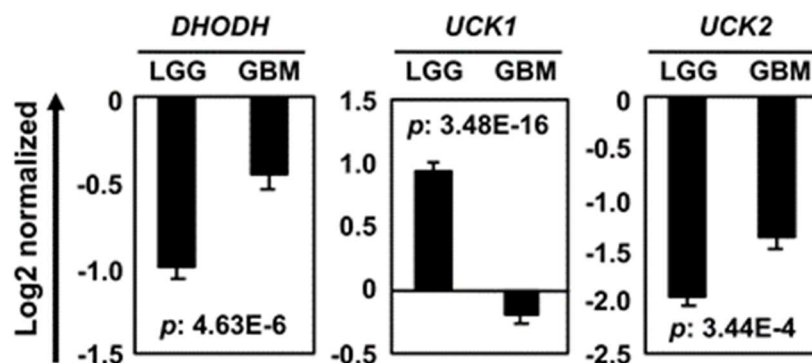


図 14 LGG 及び GBM における DHODH、UCKs の発現量をデータベースで解析 TCGA データベースを用いて 27 回のマイクロアレイから得られた DHODH、UCK1 及び UCK2 の発現量を解析した。Error bar: $\pm$ SD。有意性検定は t-test が行われた。

データベース cBioPortal を用いて DHODH の発現量と予後の関係を解析した (図 15)。DHODH の発現が上昇した患者 (赤線) の生存期間の中央値と無増悪期間の中央値は 13.11 ケ月と 4.01 ケ月であるが、他の患者 (青線) はそれぞれ

14.19 ヶ月と 7.59 ヶ月であった。このデータは GBM において DHODH mRNA レベルが上昇すると GBM 患者の生存期間が短くなることを示している。

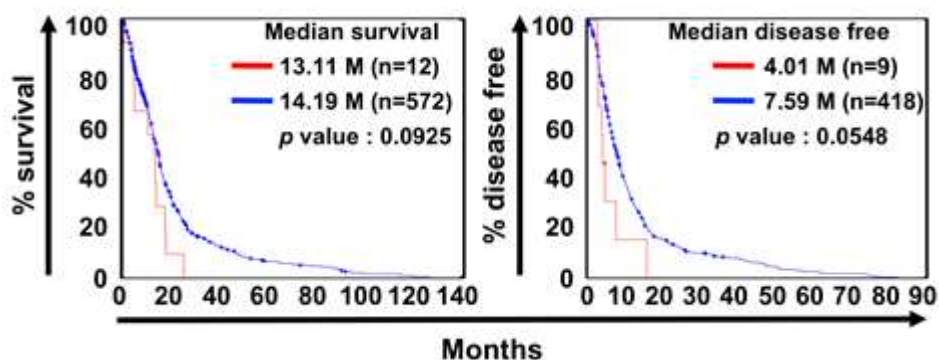


図 15 DHODH 高発現 GBM 患者の予後 データベース cBioPortal における臨床データを用いて、DHODH mRNA のが高発現している GBM 患者の予後を解析すると、赤線で示される DHODH 高発現 GBM 患者（赤線、Z-score>2）では生存期間（左パネル）、無増悪期間（右パネル）が短い傾向が示されている。

GIC を用いた 10580 による細胞毒性の回復実験を行った。E6GIC, E16GIC について 10580 と共に濃度を変えたウリジンを添加すると 500 μ M で有意に GIC 生存率の上昇が認められた（図 16）。これは 10580 が止めた de novo の経路を添加したウリジンが回復させたと考えられた。よってこれらの結果から、GIC/GICR において UCKs が発現しているにも関わらず、ピリミジン合成がサルベージ経路よりも de novo 経路に依存していることが示唆された。

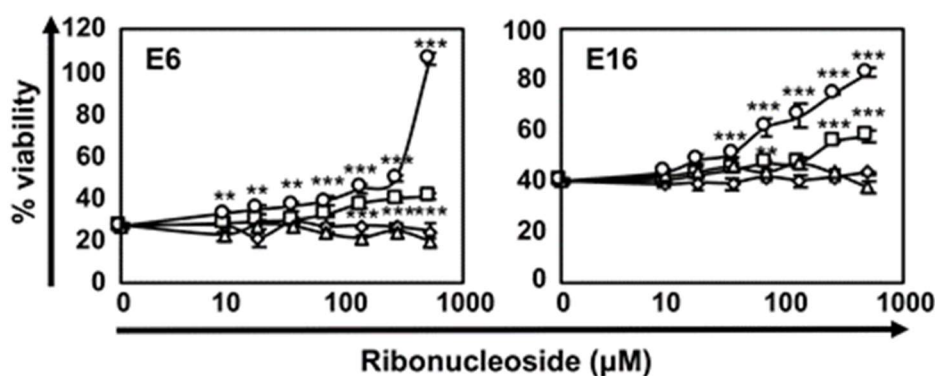


図 16 ウリジンを用いた 10580 による細胞毒性の回復実験 ウリジン（丸）を添加したときは 10580 (10 μ M) の細胞毒性を競合的に阻害したが、アデノシン（菱形）、グアノシン（四角）、シチジン（三角）などの他のリボヌクレオシドを添加したときは競合阻害が認められなかった。

Error bar : $\pm$ SD. 有意性検定は t-test を行った。** P<0.01、*** P<0.001

GIC には増殖、分化、腫瘍形成する性質がある。GIC/GICR の性質における 10580 効果を解析した。BrdU 取り込みアッセイにより、10580 の増殖を解析した(図 17)。1～4 日間 10580 で処理した GIC に BrdU を 6 時間取り込ませた後に免疫染色で BrdU を検出すると、時間と共に BrdU 陽性細胞は減少していった。このことから 10580 は増殖を抑制していることが明らかになった (図 16)。

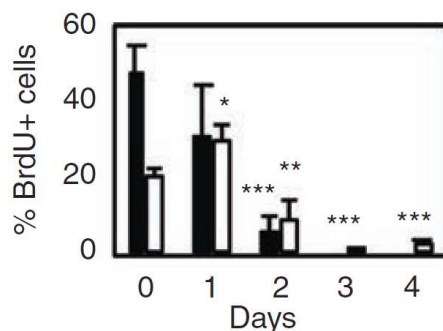


図 17 GIC/GICR の増殖に対する 10580 の効果 10580 の存在下で培養された E6GIC (黒) および E16GIC (白) の BrdU 陽性細胞の割合。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

10580 には細胞毒性があるためアポトーシスについて解析した。免疫染色で活性化カスパーゼ 3 (CASP3) を検出すると、10580 存在下では CASP3 陽性細胞の増加が認められた (図 18)。

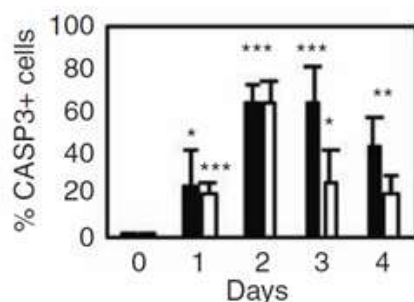


図 18 10580 によるアポトーシスの誘導 E6GIC (黒) および E16GIC (白) で培養された CASP3 陽性細胞の割合 Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

以前の実験から、使用している GIC/GICR 株は神経幹細胞マーカーである Sex determining region Y-box 2 (SOX2) と Nestin、及びアストロサイトマーカー

である Glial fibrillary acidic protein (GFAP) が高い割合で発現していること確認している(Tsukamoto et al., 2016)。また、神経細胞マーカーである β III-tubulin を発現する細胞集団も一部含んでいる。培養条件によって分化マーカーの発現する割合が変化することも明らかになっている(Kaneko et al., 2015; Ohtsu et al., 2016)。そこで 10580 処理した細胞の分化マーカーの発現を解析した(図 19)。10580 処理した GIC において SOX2 は、細胞死や分化する前に検出できなくなった。生存している 10580 処理 GIC の Nestin および GFAP の発現は時間と共に消失した。 β III-tubulin 陽性細胞は時間と共に徐々に減少したが、オリゴデンドロサイトマーカーである Galactocerebroside (GC) が陽性である細胞は 10580 処理後 4 日で一時的に増加し、その後減少した。

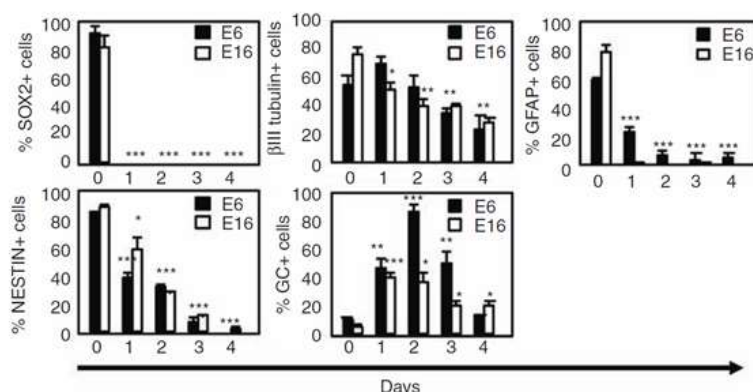


図 19 GIC/GICR の分化マーカー発現に対する 10580 の影響 10580 ($10 \mu\text{M}$) の存在下で培養された E6GIC (黒) 及び E16GIC (白の列) における神経幹細胞マーカー(SOX2、NESTIN)、もしくは分化マーカー(β III-tubulin、GFAP、及び GC)を免疫染色で検出し、陽性細胞の割合を示した。Error bar : $\pm$ SD。 有意性検定は t-test を行った。 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

SOX2 に対する DHODH の影響を解析するために、DHODH を認識する short hairpin RNA (shRNA)を用いて、DHODH ノックダウンさせた。DHODH をノックダウンした GIC において SOX2 陽性細胞の割合は E6GIC において 58%、E16GIC において 55%に低下した(図 20, 21)。また、DHODH をノックダウンすると 10580 処理 GIC と同様に活性化 CASP3 陽性細胞の割合の増加が認められた(図 20, 22)。

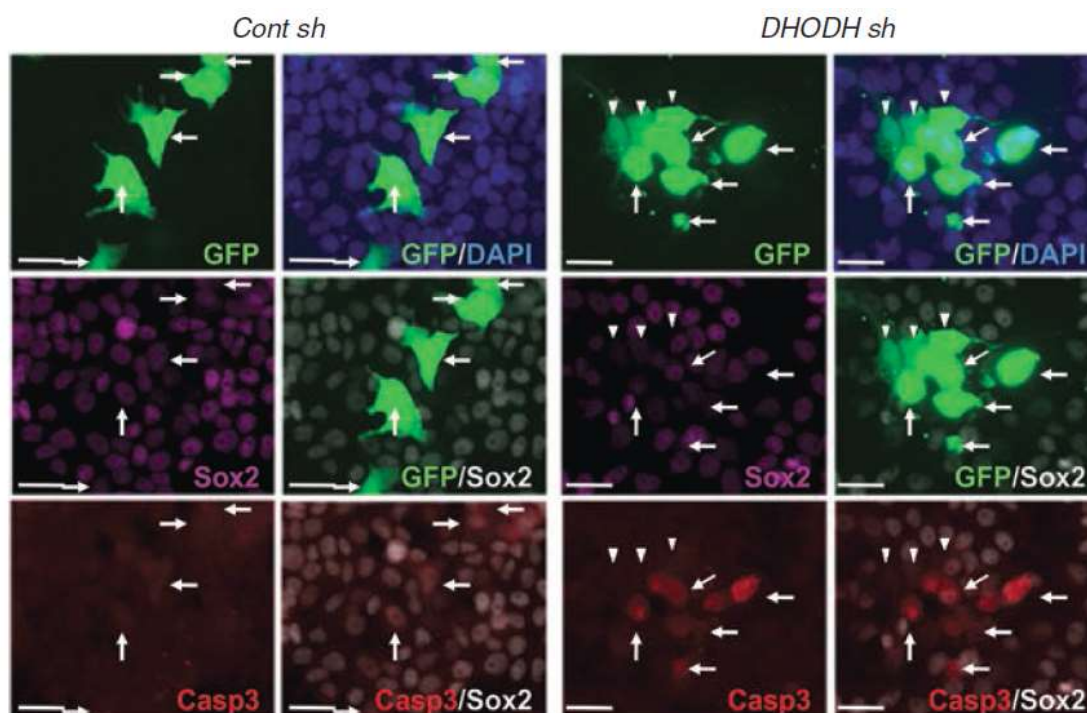


図 20 DHODH をノックダウンした GIC における SOX2 と Casp3 の発現 コントロール(cont)-sh または DHODH-sh を発現させた E6GIC における GFP (緑)、SOX2 (紫)、及び CASP3 (赤) を免疫染色で検出した。cont-sh を発現させた細胞 (左パネル) では、矢印は GFP 陽性 SOX2 陽性 CASP3 陰性細胞を示している。DHODH-sh を発現させた細胞 (右パネル) では、矢印は GFP 陽性 Casp3 陽性細胞を示し、矢頭は GFP 陽性 SOX2 陰性 CASP3 陰性細胞を示す。核は DAPI (青) で対比染色した。Bar: 30 μ m

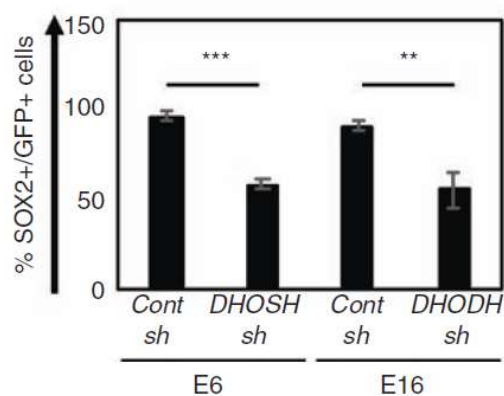


図 21 DHODH をノックダウンした GIC における SOX2 の発現 cont-sh 又は DHODH-sh を発現させた GFP 陽性 GIC における SOX2 陽性細胞の割合を示した。Error bar : $\pm$ SD 有意性検定は t-test を行った。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

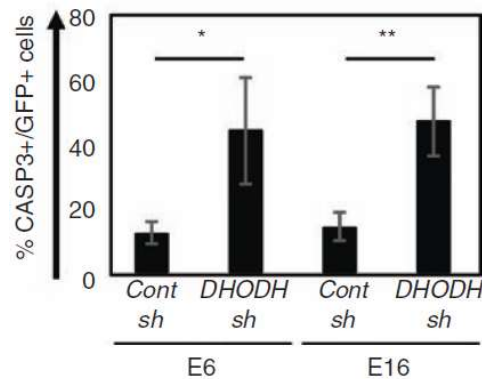


図 22 DHODH をノックダウンした GIC における Casp3 の発現 cont-sh 又は DHODH-sh 発現させた GFP 陽性 GIC における CASP3 陽性細胞の割合。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

これらの結果をまとめると、10580 が DHODH 活性を阻害することにより細胞周期の停止とアポトーシスを誘導し、また幹細胞性を低下させることが示唆された。

【考察】

まず体内に投与することを前提にするためには体内における分解されず安定した構造を保つことが最重要であったが、第一章で得られた 10607 は血中で分解されてしまった。そのため、DHODH 阻害剤を集めた化合物ライブラリーから新たに 10607 と似ている構造を持ち、経口投与しても血中で分解されない化合物として 10580 が同定された。DHODH は神経幹細胞と比較して GIC において 20 倍以上発現している遺伝子であった。DHODH の発現量が高い GBM が形成されると GBM 患者平均よりも予後が悪いことから、DHODH の阻害剤は GBM に対する抗癌剤になれる可能性があると考えられた。DHODH はピリミジン塩基の新規 (de novo) 生合成を触媒する酸化還元酵素であり、10580 はプリン合成には影響を与えずピリミジン合成を抑制する DHODH 阻害剤として機能した。

10580 は GIC/GICR の増殖抑制に関しては細胞周期を止めることに加えてアポトーシスを誘導することも明らかになった。DHODH のノックダウンは 10580 投与と同様にアポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑制した。GIC は神経幹細胞マーカーのうち、特に SOX2 の発現を抑制した。10580 は、UDP の合成経路の抑制と SOX2 の発現抑制を介して腫瘍形成を抑制していることが示唆された。

第三章 *In vivo* における GIC/GICR 由来の腫瘍に対する

10580 の効果

【緒言】

10580 は *in vitro* で GIC/GICR に対して強い細胞毒性を有することが明らかになったが、将来的には脳腫瘍の患者に投与することを目標としているため *in vivo* においても抗腫瘍効果を有しかつ安定・安全に使用できる薬剤であるか評価する必要があった。そこで、GIC/GICR を用いてマウスに形成させた腫瘍に対する 10580 の効果を、実際にマウスの体内に薬剤を投与して解析を行うこととした。GIC/GICR を移植した担癌マウスを作成し、腫瘍形成に対する 10580 の抑制効果の解析を行うべく、10580 をマウスの尾静脈から注入したところ、血液脳関門 (BBB) を通過できず脳内に到達していないことが明らかになった。このため脳に作成した腫瘍でなく、GIC を皮下に移植して形成させた腫瘍に対する 10580 の効果とその作用機構について解析した。

【方法】

1) GIC/GICR の移植

マウスを用いた全ての実験は、北海道大学の動物管理使用委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した。10% pentobarbital を 10mL/kg となるように腹腔に投与し麻酔した。皮下移植では 1×10^6 個の GICs を 50 μ l の Matrigel (BD Biosciences, USA) に懸濁し 5-8 週齢の NOD/SCID の臀部に移植した。腫瘍径が 5-6 mm に達したときに化合物の経口投与を開始した。PBS、0.5% Methyl cellulose (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) に溶解した 30 mg/kg の 10580、または PBS に溶解した 25 mg/kg Brequinair sodium (BRQ, TOCRIS, USA) をそれぞれ 200 μ L ずつ 11 日間毎日経口投与した。腫瘍サイズ (mm^3) は $\text{Length (mm)} \times \text{Width (mm)}^2 / 2$ として毎日測定した (Terawaki et al., 2011)。切り出した腫瘍を 4%PFA で固定した後、脱水・透徹処理を行った後パラフィンに包埋した。そして 10 μ m の切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色もしくは免疫染色を行った。

2) 免疫染色

脱パラフィンを行ったのちに 2%PFA 溶液で室温にて 5 分間固定したあと、抗原賦活化のために HistoVT (Nacalai Tesque, Japan) で 90℃、20 分間の処理を行い 0.3%TritonX100 と 2%スキムミルクを含む PBS で 1 時間ブロッキングを行った。その後一次抗体を 4℃で 16 時間、二次抗体を常温で 1 時間反応させた。核を DAPI にて対比染色してマウンティングを行い観察した。

一次抗体：一次抗体：biotinylated goat polyclonal anti-human Sox2 (1:200, R&D, USA)、mouse monoclonal anti-human Mitochondria (1:100, Merck Millipore, USA)、及び rabbit polyclonal anti-active Caspase 3 (1:1000, Cell Signaling Technology, USA)

二次抗体：Streptoavidin-Cy5 (1:200, Thermo Fisher, USA)、Alexa488-conjugated goat anti-mouse, -rabbit IgG (1:500, Life Technologies, USA)

【結果】

E6GICR および E16GICR を NOD/SCID マウスの脳ではなく皮下に移植し、形成される腫瘍の大きさを測定した。GIC を 10^6 個移植し腫瘍の大きさが 100mm^3 に達した後、10580 を 11 日間毎日経口投与した。10580 の投与は、移植していないマウスに投与しても毒性を疑うようなマウスの行動・体表の異常所見は認められなかった。溶媒を経口投与したマウスに形成された腫瘍の体積と比較して 10580 を投与したマウスに形成された腫瘍の体積は小さかった。E6GICR 及び E16GICR 由来の腫瘍において腫瘍形成の有意な阻害が認められた(図 23)。

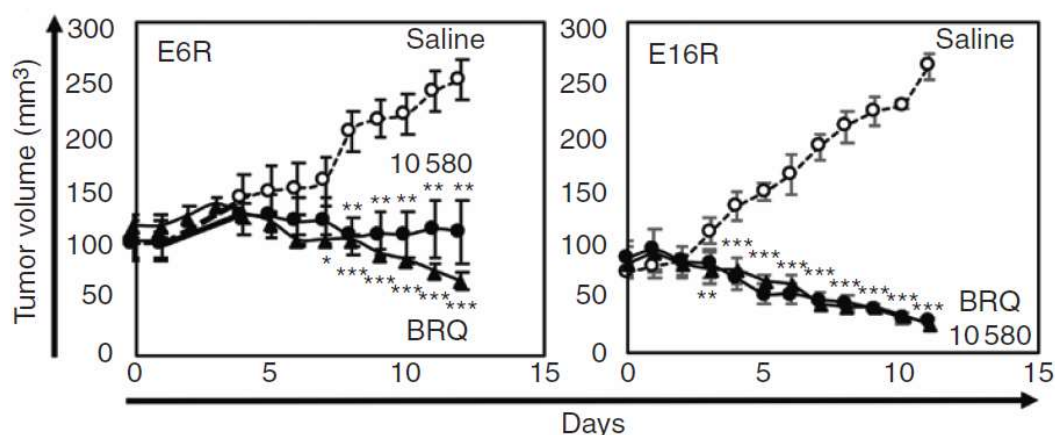


図 23 10580 及び BRQ による in vivo における腫瘍形成の抑制 E6GICR および E16GICR を移植したマウスに生理食塩水(白丸)、10580(黒丸)、または BRQ(黒三角)を毎日投与し、形成された

腫瘍体積を測定した。(n = 6)。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

次に 10580 を投与したマウスに形成された腫瘍の組織解析を行った。10580 投与後 12 日目に形成された腫瘍を摘出し、腫瘍組織の切片を作成し解析した。10580 が投与されたマウスに形成された腫瘍は、腫瘍細胞の密度および腫瘍の体積が減少していた。(図 24)。

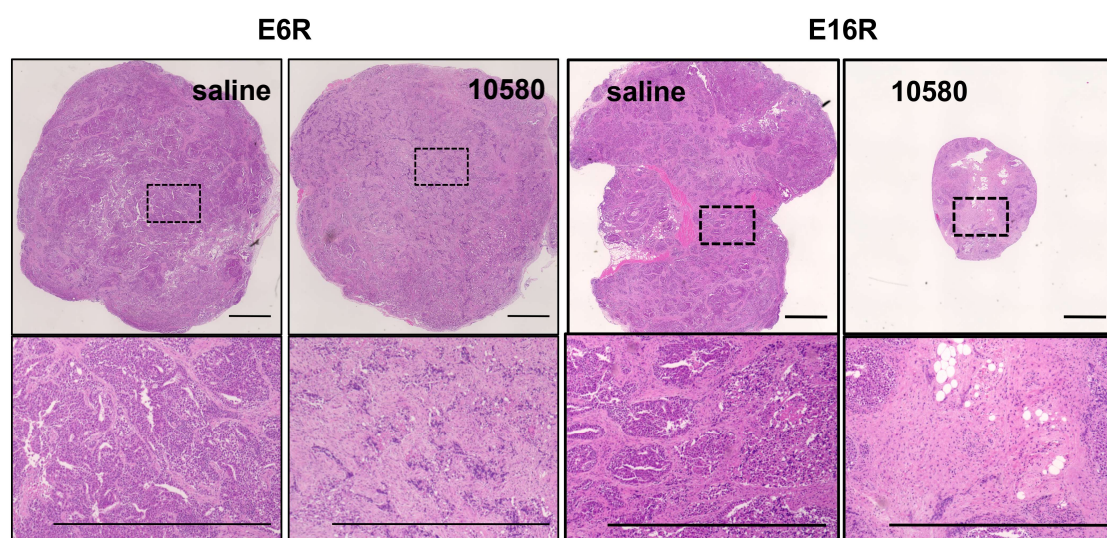


図 24 10580 の投与による腫瘍組織像の変化。10580 が投与されたマウスにできた E6GICR 及び E16GICR 由来腫瘍切片の HE 染色像。下段は上段の破線で囲まれた部位を拡大。bar: 1 mm

次いで、10580 を投与したマウスの腫瘍切片における SOX2 陽性細胞の割合を免疫染色することにより解析した。ミトコンドリアと共に染色し、生きた細胞中の SOX2 の割合を解析すると、10580 を投与した GICR 由来の腫瘍においては SOX2 陽性細胞の割合が有意に減少していた。(図 25)。

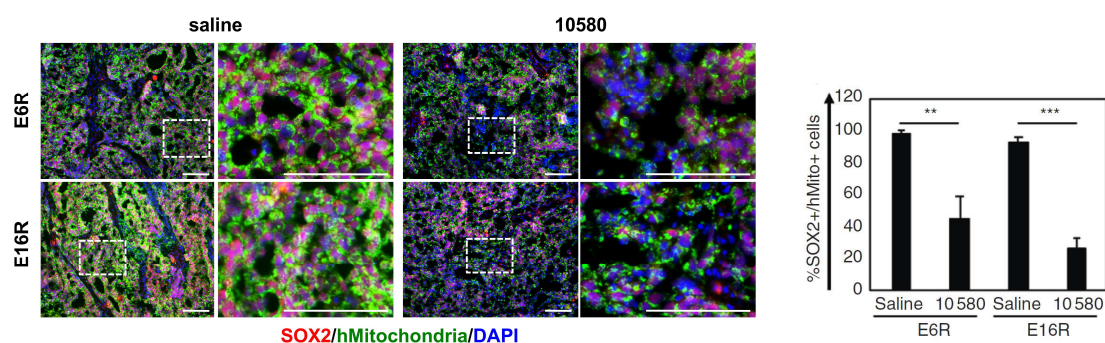


図 25 10580 を投与した GICR 由来腫瘍切片における SOX2 陽性細胞の割合 E6GICR 及び E16GICR 由来の腫瘍切片を SOX2 (赤)とミトコンドリア(緑)を認識する抗体で染色した。DAPI(青)で核染色を行った。bar: 100µm Error bar : ±SD。有意性検定は t-test を行った。 ** P<0.01、*** P<0.001

活性化 CASP3 陽性細胞の割合を解析すると、10580 を投与したマウスの腫瘍において活性化 CASP3 陽性細胞の割合の有意な増加が認められた (図 26)。

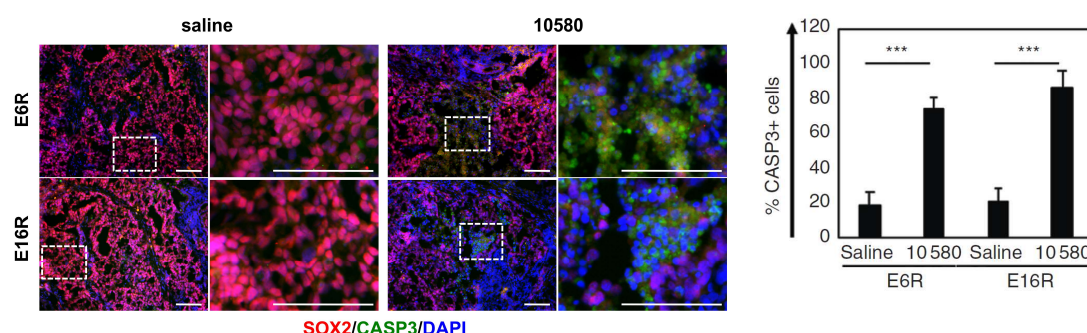


図 26 10580 を投与した GICR 由来腫瘍切片における CASP3 陽性細胞の割合 E6GICR もしくは E16GICR 由来の腫瘍切片を SOX2 (赤)と Caspase (CASP)3 (緑)を認識する抗体で染色した。DAPI(青)で核染色を行った。 bar: 100µm Error bar : ±SD。有意性検定は t-test を行った。*** P<0.001

また、抗腫瘍薬として最近実証された BRQ の抗 GICR 活性についても解析した (図 23)。BRQ も 10580 と同様に GICR の腫瘍形成を抑制していた。これらの結果は、経口投与された DHODH 阻害剤は、生体内でも GICR の腫瘍形成に対して細胞増殖の抑制と SOX2 の発現を抑制することを介し、抑制的に働くことを示した。

【考察】

10580 を経口投与すると TMZ 耐性株である E6GICR 及び E16GICR 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。阻害効果は従来 DHODH 阻害剤として知られていた BRQ と同程度であった。また 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し、SOX2 の発現抑制やアポトーシスの誘導も起こすことが明らかになった。飼育の過程で、正常マウスに薬剤投与しても体重減少や毛並みの増悪など、外観

上の異常や活動性の低下などの有害事象を生じなかったことも確認された。これらの結果から、10580 は TMZ と同様に経口投与で摂取されても血中で分解されず、皮下にできた腫瘍に浸透し、正常組織に影響を与えずに TMZ が無効である GBM に対しても腫瘍の成長を抑制することが考えられた。また *in vivo* においても 10580 によってピリミジン合成経路の阻害が起こっていることも示唆された。

第四章 10580 の SOX2 を介した細胞毒性の分子メカニズム の解析

【緒言】

GIC において幹細胞性に関わっている転写因子 SOX2 は、10580 で処理された GIC において急速に消失したため、DHODH 活性の阻害が SOX2 の機能を低下させることが考えられた。10580 の GIC に対する高い特異性は、ピリミジン合成経路だけでなく、SOX2 にも関与していることは明らかである。しかし 10580 がどのような機構で SOX2 に影響を与えるかという事は未知であり、ピリミジン合成経路阻害との関連がまだ問題として残っている。

SOX2 は翻訳後修飾により機能を制御されている。SOX2 の sex determining region Y-related high mobility group ドメインにおける 75 番目のリジン (K75) のアセチル化は、核外輸送の際に Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1、別名 Exportin1) との相互作用に必須であり、リジンをアラニンに置き換えた SOX2 変異体 (SOX2 K75A) は核にとどまることが知られている (Baltus et al., 2009; Kamachi and Kondoh, 2013)。また胚性幹 (ES) 細胞が分化すると SOX2 の 248 番目のセリン (S248) において O-GlcNAcylation が減少し、また 248 番目のセリンをアラニンに置換 (SOX2 S248A) すると未分化性を維持しやすくなり、iPS 細胞を作る際にリプログラミングしやすいという報告がある (Jang et al., 2012)。

Uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) は、糖ヌクレオチドの一つであり、代謝における UDP-GlcNAc はグリコシル基転移酵素によってタンパク質に GlcNAc 残基を修飾することで SOX2 や様々な転写因子の機能調節を行うことが知られている。

そこで変異 SOX2 である SOX2 K75A 及び SOX2 S248A を作成し、UDP-GlcNAc を介した SOX2 の修飾と、O-GlcNAcylation を介した 10580 による SOX2 の核局在や細胞毒性に対する影響を解析することにした。

【方法】

1) 細胞培養

CRM1 抑制実験では E6GIC と E16GIC を 10580 ($10\ \mu\text{M}$) と CRM1 阻害剤の Leptomycin B (LMB) ($0.15\ \text{nM}$) と共に 1 日間培養した。そして免疫染色で SOX2 を検出した。10580 依存的の細胞死の抑制実験では、E6GIC および E16GIC は、Pan カスパーゼ阻害剤である benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-alanyl-fluoromethyl ketone (Z-VAD-FMK; $50\ \mu\text{M}$, Peptide Institute, Japan) と共に 2 日間培養した後、MTT アッセイ及び免疫染色で SOX2 の検出を行った。

2) 免疫沈降とウェスタンブロット

細胞を氷上で lysis buffer (0.5% (v/v) Nonidet-40, $10\ \text{mM}$ Tris-HCl, $150\ \text{mM}$ NaCl, $5\ \text{mM}$ EDTA, $2\ \text{mM}$ Na_3VO_4 , $1\ \text{mM}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin; pH7.6) に懸濁した。懸濁液を遠心分離 ($15,000\ \text{rpm}$, 10min , 4°C) し、沈殿を除いた上清にコントロール IgG、もしくは抗 FLAG M2 抗体 (SIGMA, USA) と Protein A Sepharose (PAS; GE Healthcare, Milwaukee, Wis, USA) を加えて免疫沈降を行った。 4°C , 4 時間ローターで回転させた後、PAS を 3 回 lysis buffer で洗浄し、sample buffer に懸濁してタンパク質溶液とした。タンパク質溶液を SDS-PAGE で分離後に Hybond-P へ転写した。5% スキムミルクを含む TBS-T でブロッキングを 20 分間行い一次抗体に室温で 1 時間、一次抗体に対応した horseradish-peroxidase (HRP) 標識二次抗体を室温で 30 分反応させ、標識されたタンパク質を化学発光システム (ECL; Amersham Bioscience Corp, USA) により検出した。

一次抗体: mouse anti-FLAG M2 ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$, SIGMA, USA), mouse anti-O-GlcNAc ($1:100$, Abcam) and GAPDH ($1:5000$, Proteintech, USA)

二次抗体: anti-mouse IgG-HRP ($1:5000$, Santa Cruz Biotechnology, USA)

3) ベクターコンストラクション

全長ヒト SOX2 cDNA は E6GIC cDNA から KOD Plus-Ver.2 polymerase (Toyobo, Japan) を用いた PCR 法で単離した。SOX2 変異体 (K75A and S248A) は下記変異体作成用プライマーを用いて PCR 法で作成した。cDNA は p3xFLAG CMV10 ベクターに挿入し、p3xFLAG CMV10-hSOX2wt、-hSOX2 K75A、及び -hSOX2 S248A とした。

DNA プライマー

human SOX2 全長作成用プライマー

5' -AGAATTCAATGTACAACATGATGGAGACG-3'

5' -AGGATCCTCACATGTGTGAGAGGGGCA-3'

K75A 変異体作成用プライマー

5' -GAGATCAGCGCGCGCCTGGG-3'

5' -CCCAGGCGCGCGCTGATCTC-3' ;

S248A 変異体作成用プライマー

5' -TGGTCAAGGCCGAGGCCAG-3'

5' -CTGGCCTCGGCCTTGACCA-3' ' .

PCR 断片はベクターにクローニングした後、シーケンサーを用いて配列に変異が入っていないことを確認した。ベクターは前述の方法で GIC に形質変換された。

【結果】

まず、GIC おける SOX2 の核局在と CRM1 の関連を解析した。CRM1 阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) の存在下で 10580 と共に培養した場合における、SOX2 の局在を免疫染色により検出した(図 27)。各 GIC において、核に観察された SOX2 は 10580 と共に培養すると核内の SOX2 は著しく減少した(図 27, control)。しかし 10580 と共に LMB を添加して培養すると核内に SOX2 が検出された(図 27 10580+LMB)。このことは GIC 内で 10580 が CRM1 依存的に SOX2 の核外輸送を誘導したと考えられた。

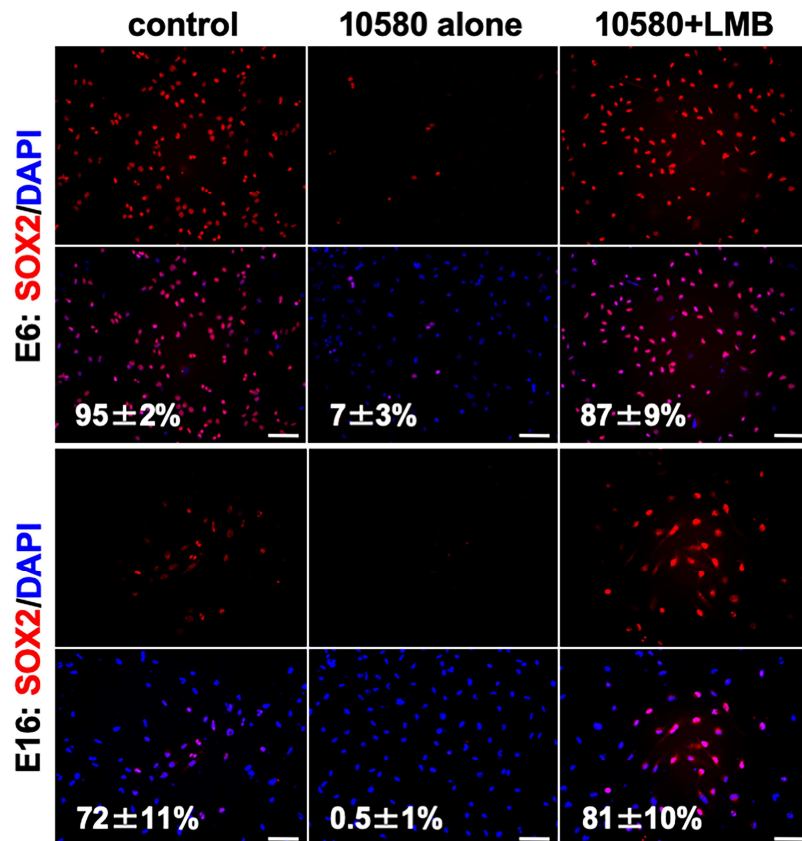


図 27 GIC における 10580 と CRM1 による SOX2 の核外輸送 E6GIC 及び E16GIC は、LMB (0.15 nM) と 10580 (10 μ M) の存在下で 1 日間培養し、SOX2 の局在を観察した(赤)。 数字は DAPI により核染色された細胞における核 SOX2 陽性細胞の割合を示している。bar: 100 μ m

SOX2 はアセチル化が起きると核外輸送が起きるが、他の転写因子の局在を考えたときに、転写因子 β -catenin は、O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) による修飾である O-GlcNAcylation が報告されていた (Sayat et al., 2008; Yang and Qian, 2017)。O-GlcNAcylation は、転写因子の核局在を調節し、癌や幹細胞で重要な役割を果たすことが知られている (Bond and Hanover, 2015; Fardini et al., 2013; Ferrer et al., 2014; Jang et al., 2012)。

GIC において O-GlcNAcylation の基質である uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) を代謝物分析すると、10580 と共に培養した GIC においては UDP-GlcNAc が減少していたため 10580 が UDP-GlcNAc の合成も阻害したと考えられた。(図 28)。

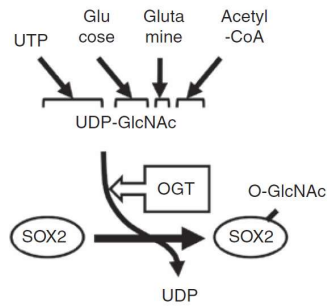


図 28 O-GlcNAc transferase (OGT)/UDP-GlcNAc 反応による SOX2 の O-GlcNAcy 化 OGT は UDP-GlcNAc の GlcNAc を SOX2 に修飾する

SOX2 の O-GlcNAcy1 化と 10580 の関係を解析するために、10580 と共に UDP-GlcNAc 過剰に加えて 2 日間培養し、SOX2 の発現を免疫染色で検出した。E6GIC を 10580 と共に培養すると、SOX2 陽性細胞は 1.5%までに減少したが、10580 と共に UDP-GlcNAc を加えると SOX2 陽性細胞割合は 49% であった(図 29)。E16GIC の場合も 10580 によって生じる SOX2 陽性細胞の減少は UDP-GlcNAc により抑制された。

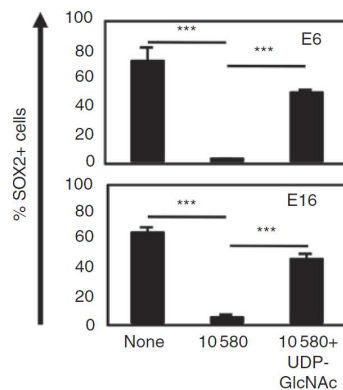


図 29 GIC における SOX2 発現に対する 10580 と UDP-GlcNAc の効果 E6GIC 及び E16GIC を 10 μ M 10580、1mM UDP-GlcNAc 存在下で培養した場合の SOX2 陽性細胞の割合。

UDP は O-GlcNAcy1 化の過程で UDP-GlcNAc から放出されるため、GIC における 10580 による細胞毒性に対する UDP の影響も解析した。UDP も UDP-GlcNAc と同様に濃度依存的に 10580 の細胞毒性を抑制したが、UDP-GlcNAc の方がその効果は高かった(図 30)。また図 15 で示したウリジンを添加したときと比較しても低い濃度で細胞毒性に対する抑制が認められた。

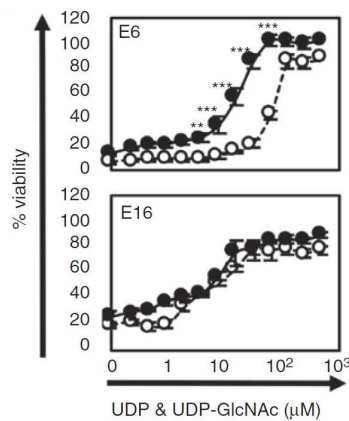


図 30 10580 による細胞毒性に対する UDP 及び UDP-GlcNAc の影響 10580 (10 μ M) 処理した E6GIC 及び E16GIC に UDP (白丸) 及び UDP-GlcNAc (黒丸) を $\sim$ 1mM まで濃度を変えて添加したときの生存率を MTT アッセイで解析した

UDP と UDP-GlcNAc で濃度は違うが同じ効果が認められた。UDP に結合している O-GlcNAcy1 基が 10580 の存在下でどのように作用しているかを特定することは現在のところ困難である。しかし UDP-GlcNAc の方が UDP よりも低い濃度で効果を発揮することは、SOX2 のどこかが O-GlcNAcy1 化された結果である可能性が考えられた。

この実験を踏まえて次に SOX2 の O-GlcNAcy1 化に対する 10580、UDP、及び UDP-GlcNAc の影響を解析するために GIC における GlcNAcy1 化 SOX2 を検出した。FLAG タグ付き SOX2 を GIC に発現させ DMSO、10580、10580+UDP、又は 10580+UDP-GlcNAc の存在下で培養し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した後ウエスタンブロットで検出した。10580 のみを加えた GIC では SOX2 の O-GlcNAcy1 化が減少するのに対し、UDP または UDP-GlcNAc のいずれかを加えると、10580 を加えた GIC の SOX2 の O-GlcNAcy1 化の上昇が認められた。(図 31)。

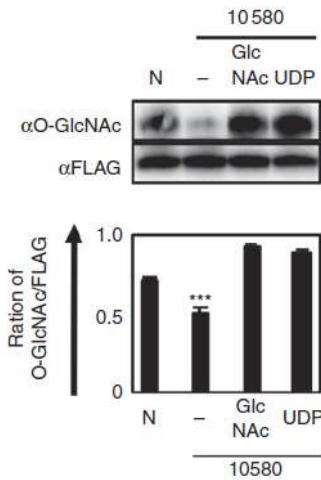


図 31 E6GIC の SOX2 の O-GlcNAcy1 化に対する 10580、UDP-GlcNAc、及び UDP の効果 SOX2-FLAG を強制発現させた E6GIC の溶解物を抗 FLAG 抗体 (α FLAG) で免疫沈降した。抗 O-GlcNAcy1 抗体 (α O-GlcNAcy1) を用いてウエスタンブロットを行い O-GlcNAcy1 化 SOX2 を検出した。(パネル上段)。ImageJ ソフトウェアを用いてシグナルの強度を定量し、 α O-GlcNAcy1 で得られたシグナル強度と α FLAG で得られたシグナル強度の比をグラフに示した (パネル下段)。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。 *** $P < 0.001$

O-GlcNAcy1 化と細胞の生存率を解析するために、O-GlcNAc transferase (OGT) の阻害剤である OSMI-1 の存在下で GIC を培養し、細胞増殖と SOX2 の発現を解析した。OSMI-1 は、濃度依存的に GIC 増殖を阻害した (図 32)。

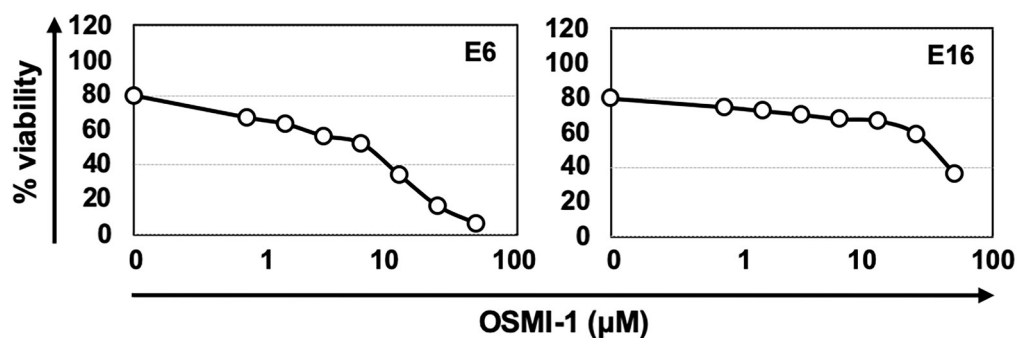


図 32 GIC に対する OGT 阻害剤である OSMI-1 の効果 E6GIC 及び E16GIC を様々な濃度の OSMI-1 と共に 3 日間培養し、MTT アッセイを用いて細胞生存率を解析した。

また、OSMI-1 存在下で培養したときの核における SOX2 陽性細胞の割合を免疫染色で解析した。OSMI-1 存在下で E6GIC 及び E16GIC を培養すると SOX2 陽性細胞の割合が減少した。(図 33)。これらの結果は GIC において SOX2 の O-

GlcNAcy1 化は核局在に必要な修飾で O-GlcNAcy1 化を抑制すると SOX2 は核に局在できずに生存率が下がることを示唆している。

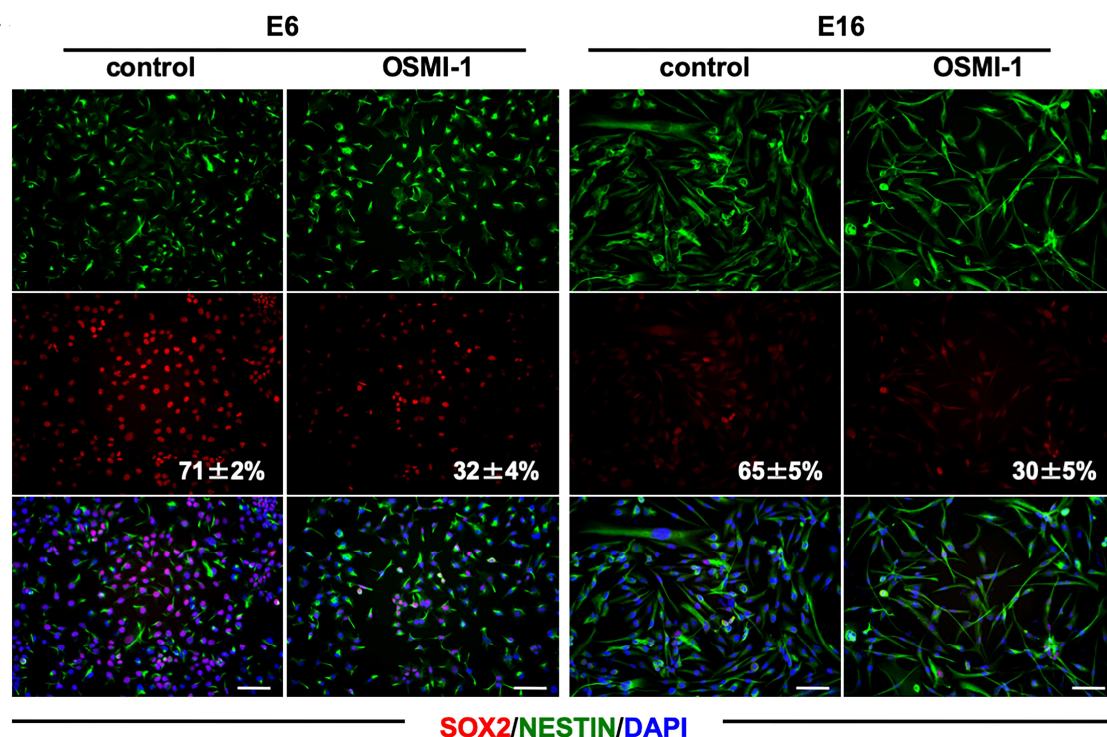


図 33 GIC に対する OSMI-1 の効果 E6GIC 及び E16GIC を OSMI-1 (20 μ M) の存在下で 2 日間培養した後、SOX2 (赤) および NESTIN (緑) を検出した。DAPI を用いて核染色を行った (青)。DAPI で染色された核に SOX2 が発現している細胞の割合を数字で示した。Bar: 100 μ m。

最後に SOX2 の 10580 依存的核外輸送と細胞毒性との関係を解析した。野生型 SOX2 (SOX2wt) と、SOX2 において翻訳後修飾が起きるアミノ酸を置換した変異体 SOX2 K75A、及び SOX2 S248A を発現するベクターを作成し、GIC に強制発現させた。10580 の存在下における SOX2 の核局在は K75A を強制発現させた場合は 60% 以上核内に残った。O-GlcNAcy1 化が阻害される SOX2 S248A を強制発現させた場合の核局在は 20% 以下で、E6GIC においては SOX2 wt を強制発現させた場合と比べて有意に低下していた (図 34)。

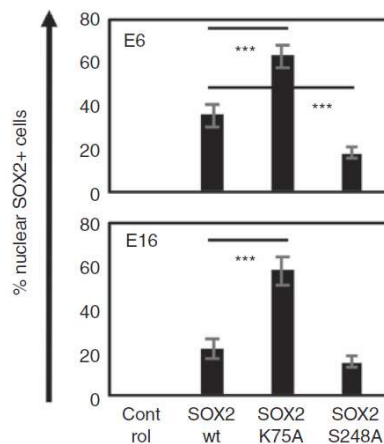


図 34 SOX2 変異体を強制発現した GIC に 10580 を作用させた場合の SOX2 の核局在 E6GIC 及び E16GIC に SOX2 wt、SOX2 K75A、または SOX2 S248A をそれぞれ強制発現させて 10580 存在下で培養した。核における SOX2 の発現を免疫染色で検出し核 SOX2 陽性細胞の割合を示した。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。*** $P < 0.001$

同様に SOX2 変異体を強制発現した GIC に 10580 を作用させた場合の SOX2 の生存率を解析した。SOX2 K75A を強制発現させた GIC では、コントロール GIC および SOX2 wt または SOX2 S248A を発現する GIC と比較して、10580 による細胞毒性に耐性があった。しかし SOX2 K75A の過剰発現生存率が 50%に低下したことから完全な耐性が得られたわけではなかった (図 35)。

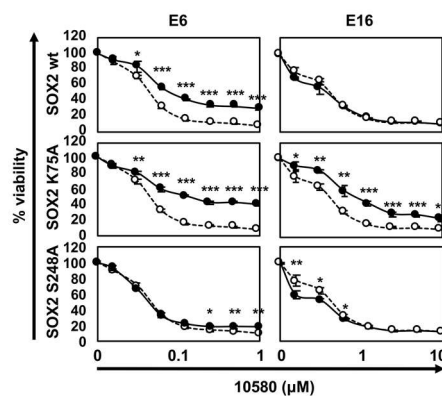


図 35 SOX2 変異体を強制発現した GIC に 10580 を作用させた場合の SOX2 発現細胞の生存率 E6GIC 及び E16GIC に SOX2 wt (白丸)、SOX2 K75A (中段、黒丸)、または SOX2 S248A (下段、黒丸) をそれぞれ強制発現させて様々な濃度の 10580 存在下で培養した。MTT アッセイで生存率を解析した。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

これらの結果は、10580 が GIC に与える細胞毒性の原因は SOX2 の核外輸送だけではないことを示している。SOX2 の核局在と細胞死の関係を解析するために、Pan カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK を添加すると、GIC に対する 10580 の細胞毒性が一時的に緩和された(図 36)。一方で SOX2 の核外輸送は阻害されなかった(図 37)。

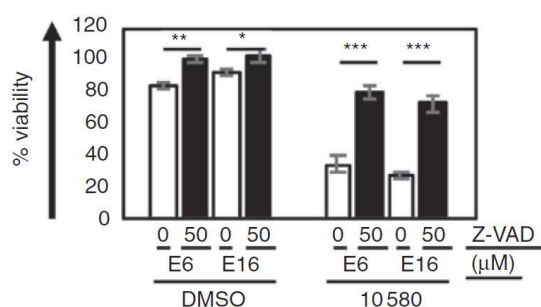


図 36 Pan カスパーゼ阻害剤を用いた 10580 によって誘導されるアポトーシスの阻害

E6GIC 及び E16GIC を 10580 と Pan カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK) の存在下 (黒) または非在下 (白) で培養したときの生存率を MTT アッセイにより解析。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

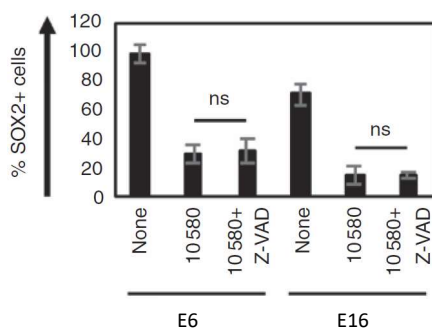


図 37 Pan カスパーゼ阻害剤を用いた場合の 10580 によって誘導される SOX2 の核外輸送

E6GIC 及び E16GIC を 10580 と Z-VAD-FMK の存在下または非在下で培養したときの SOX2 の発現を解析。Error bar : $\pm$ SD。有意性検定は t-test を行った。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

細胞死を抑制しても SOX2 の核外輸送は起こること、SOX2 の核外輸送を抑制しても細胞死が起こるという結果は、10580 によって誘導される SOX2 の核外輸送と細胞の増殖抑制は独立した現象であることを示している。GIC を消失させ

るためには核外輸送とピリミジン合成経路の両方を阻害する必要があり、両方阻害できる 10580 は有効な GIC の抗癌剤になることが考えられた。

【考察】

SOX2 の核外輸送にはアセチル化された K75 と CRM1 との相互作用があることが知られていた。GIC における SOX2 に関しても CRM1 と相互作用すると核外輸送されることが分かった。転写因子の研究から、O-GlcNAcy1 化は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 10580 の存在下では UDP-GlcNAc の合成量が減少し、10580 存在下で GIC に UDP-GlcNAc を加えると SOX2 は核内にとどまり、且つ細胞毒性が軽減されることがわかった。また UDP-GlcNAc を加えると SOX2 は O-GlcNAcy1 化されたため、SOX2 の O-GlcNAcy1 化は核局在に関与していると考えられた。

SOX2 変異体 SOX2 K75A は 10580 存在下でも核に局在していた。これは SOX2 K75A が CRM1 と相互作用できなかったことを示している。また、SOX2 S248A は核内にとどまることができなかった。これは SOX2 S248A が O-GlcNAcy1 化されなかったことを示唆している。SOX2 K75A を発現させ核局在し易い状況にある GIC にあっても 10580 による細胞毒性は完全には回避できていなかった。また、カスパーゼ阻害剤で細胞死を抑制しても SOX2 の核外輸送は起こった。これらの結果より SOX2 の制御だけやピリミジン合成経路の阻害だけでは GIC に抗腫瘍効果は不十分であることが分かる。

10580 の抗腫瘍効果は単独の標的に対してではなく、ピリミジン合成経路を阻害し、SOX2 を核外輸送するという多方面からの作用を有することで、副作用少なく GIC 特異的に細胞毒性を発揮する有効な抗癌剤になる可能性があると考えられた。

考察

本研究にて、化合物ライブラリスクリーニングにより、GIC/GICR に対し細胞増殖抑制、細胞死、幹細胞性の喪失を誘導する化合物 10580 を同定した。更に、リガンドフィッシング法により同化合物の標的因子がピリミジン合成を触媒する酵素 DHODH であることを決定した。担癌マウスに経口投与を繰り返し、生体においても高い抗腫瘍効果を有すること、有意な有害事象を示さないことを確認し、10580 が将来的に有効な抗癌剤候補となり得る可能性を示した。現在、DHODH は、急性骨髄性白血病、膵臓癌、及びメラノーマなどの悪性腫瘍の潜在的な治療標的であることが知られているが、今回、その阻害剤が GIC/GICR に対しても細胞毒性を有することを示すことができた (Koundinya et al., 2018; Sykes et al., 2016b; White et al., 2011)。既知の DHODH 阻害剤との比較により 10580 は、BRQ (12nM)、テリフルノミド (262nM)、およびビドフルジマス (141nM) などよりも低い IC₅₀ 値 (9nM) を持つ、最も強力な DHODH 阻害剤であることが判明した。

いくつかの DHODH 阻害剤は免疫系を抑制するため、臨床では抗リウマチ薬として使用されている。このため免疫抑制が DHODH 阻害剤の副作用となり得るが、BRQ で処理したマウスの造血幹細胞は、未処理のマウスの造血幹細胞と機能的に同等であった (Sykes et al., 2016a)。さらに、GIC 及び GICR に対する 10580 の細胞毒性は非常に強力であることから、短期間及び少量での使用で効果が得られることも期待される。脳実質への移行性を考慮する際、血液・脳関門 (BBB) が問題になるが、中枢神経原発性悪性リンパ腫に対し使用されるメソトレキセートなどは大量に全身投与を行うことにより脳への移行を期待する。ただ高濃度故に全身への副作用も大きく、毒性を軽減する治療を併用する必要があることが知られている (Chu E et al., 2011)

今回、10580 も脳への移行性が低いことがわかり脳腫瘍への投与は行っていないが、少量の組織移行のみで薬効を示せる可能性や、マウス生体への投与で副作用が小さいことを考えると、大量に投与した場合でも正常組織への副作用を少なく投与できることが示唆された。

10580 は、GIC 及び GICR に対して特異的に細胞毒性を示し、NSC を含む正常細胞に対する細胞毒性が弱いことから、GIC/GICR が生存と維持のために DHODH を主要酵素として含む de novo ピリミジン合成経路に大きく依存するという新しいメカニズムが明らかになった。また、DHODH は NSC を含む正常細胞よりも GIC 及び GICR において強く発現しており、DHODH ノックダウンは GIC の増殖を

抑制することからも腫瘍増殖をコントロールしていることが示された。また、少量の UDP が GIC/GICR で 10580 誘導の細胞毒性を救済したのに対し、同じ結果を達成するには大量のウリジンが必要であった。即ち、腫瘍細胞でのピリミジン合成において、DHODH が阻害されても、その代謝産物 UDP の存在により、腫瘍細胞の核酸合成はスムーズに行われ腫瘍は増殖し、細々と機能するサルベージ回路に基質を投入し補助しても腫瘍は増えないのである。一方で、ピリミジンは脳の細胞を含む多くの種類の正常細胞及び正常組織においては主にサルベージ経路を介して合成されている (Balestri et al., 2007)。これらからも、DHODH 阻害剤が副作用の少ない強力な抗腫瘍作用を持つことが示唆された。

分子機構の解明においては、10580 は *in vitro* 及び *in vivo* で GIC における幹細胞マーカー SOX2 の発現レベルを劇的に低下させることを明らかにした。SOX2 の減少は、核外輸送複合体 CRM1 に依存的な核外輸送の加速によって引き起こされる。10580 投与によって生じる SOX2 陽性 GIC の減少は、CRM1 の特異的阻害により完全にブロックされ、CRM1 が結合しない場合には核内に保持されることを示した。更に、SOX2 が O-GlcNAcylation 化することでその核局在を保つことを示し、10580 はその O-GlcNAc 化を阻害することで核内の SOX2 を減少させ幹細胞性を欠失させることに寄与すると考えられた。すなわち、10580 は SOX2 と CRM1 の相互作用を阻害することと SOX2 の O-GlcNAc 化を阻害することにより抗腫瘍効果を得ていることが示唆された。

O-GlcNAcylation 化は、シグナル伝達、転写、エピジェネティクス、及びその他のプロセスに関与する重要な分子を改変することにより、多くの生物学的機能を調節することが示されている。癌細胞がグルコース、アミノ酸、脂肪酸、及びヌクレオチドの取り込みを増加させることで、UDP-GlcNAc のレベルが増加し、p53、NF- κ B、Myc などの重要な因子の O-GlcNAcylation 化が加速されることがよく知られている。HIF1、SOX2、HDAC1、Sirtuin 1、および phosphofructokinase1 (PFK1) は、幹細胞性および腫瘍形成において重要な役割を果たす (Baltus et al., 2009; Fardini et al., 2013; Hanover et al., 2018; Jang et al., 2012; Kamachi and Kondoh, 2013; Sayat et al., 2008; Yang and Qian, 2017)。特に、PFK1 の O-GlcNAcylation 化は、hexosamine 生合成を増大させることにより UDP-GlcNAc を増加させ、UDP-GlcNAc 生成の正のフィードバックループを作成する。したがって、O-GlcNAcylation 化がこれらの重要な因子の機能を制御する詳細なメカニズムを解明することが不可欠となる。

ここでは、明白な副作用なしに GIC/GICR を特異的な細胞毒性を有する化合物として DHODH 阻害剤 10580 を示している (図 38)。10580 は BBB を通過しな

かったため、次の課題は 10580 デリバリーシステムを開発するか、GBM 療法のために BBB を通過できる新しい DHODH 阻害剤を見つけることである。

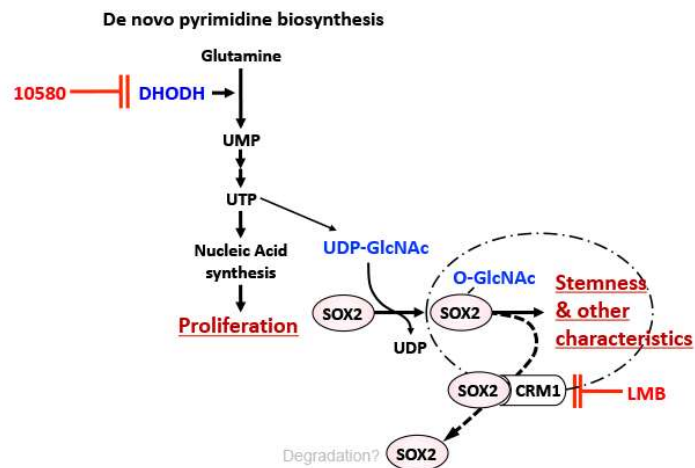


図 3 10580 の GICR に対する作用機構の模式図

核酸新規合成阻害と SOX2 の核外輸送で GIC 特異的に細胞毒性を与える。

総括および結論

- 1) GBM 患者の腫瘍から樹立された TMZ 耐性 GBM に対して細胞毒性を有し、正常細胞への毒性が低い化合物として、10580 を同定することができた。
- 2) 10580 は DHODH に結合することで阻害剤として機能し、核酸合成経路の中で GBM を活性化している *de novo* ピリミジン合成経路を阻害することが明らかになった。
- 3) 10580 は GBM で強く発現し細胞増殖や幹細胞性に関わっている転写因子 SOX2 にも間接的に作用し、SOX2 の核外輸送を促進することで、GIC の腫瘍形成を抑制した。
- 4) マウスに TMZ と同じように 10580 を経口投与したとき、血中で十分な薬効を保つ濃度を保ち、正常組織には影響を与えずに、皮下に形成された GICR 由来の腫瘍に対して特異的に細胞毒性を示した。
- 5) 悪性脳腫瘍の治療薬として 10580 を使用するために、少量でも薬剤が脳内に到達する必要がある、脳内への化合物のデリバリーシステム開発の他、BBB 破綻による薬剤の浸透の可能性を期待して大量投与を行う方法など、更なる実験・検証が必要と考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、共同で本研究を進めてくださり、ご指導、ご協力を賜わりました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学教室および遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野の教室員をはじめ多くの関係者の皆様に心より感謝申し上げます。また、本研究の機会を下さいました北海道大学高次脳機能創発分野寶金清博特任教授ならびに北海道大学遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野近藤亨教授に謝意を表します。化合物ライブラリーの提供及び薬物動態解析を頂いた富士フイルム株式会社、標的因子の検索・同定頂いた産業技術総合研究所に深謝申し上げます。

最後に本研究にご協力いただきました脳神経外科教室員および秘書の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- Araki, K., Kusano, H., Sasaki, N., Tanaka, R., Hatta, T., Fukui, K., and Natsume, T. (2016). Redox Sensitivities of Global Cellular Cysteine Residues under Reductive and Oxidative Stress. *J Proteome Res* *15*, 2548–2559.
- Balestri, F., Barsotti, C., Lutzemberger, L., Camici, M., and Ipata, P.L. (2007). Key role of uridine kinase and uridine phosphorylase in the homeostatic regulation of purine and pyrimidine salvage in brain. *Neurochem Int* *51*, 517–523.
- Baltus, G.A., Kowalski, M.P., Zhai, H., Tutter, A.V., Quinn, D., Wall, D., and Kadam, S. (2009). Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells* *27*, 2175–2184.
- Blough, M.D., Westgate, M.R., Beauchamp, D., Kelly, J.J., Stechishin, O., Ramirez, A.L., Weiss, S., and Cairncross, J.G. (2010). Sensitivity to temozolomide in brain tumor initiating cells. *Neuro Oncol* *12*, 756–760.
- Bond, M.R., and Hanover, J.A. (2015). A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol* *208*, 869–880.
- Chu, E., Bruce, A., and Chabner, D.L., (2011) Antifolates. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*, 2nd ed
- Fardini, Y., Dehennaut, V., Lefebvre, T., and Issad, T. (2013). O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne)* *4*, 99.
- Ferrer, C.M., Lynch, T.P., Sodi, V.L., Falcone, J.N., Schwab, L.P., Peacock, D.L., Vocadlo, D.J., Seagroves, T.N., and Reginato, M.J. (2014). O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Mol Cell* *54*, 820–831.
- Gupta, P.B., Onder, T.T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R.A., and Lander, E.S. (2009). Identification of selective

- inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* **138**, 645–659.
- Hanover, J.A., Chen, W., and Bond, M.R. (2018). O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J Bioenerg Biomembr* **50**, 155–173.
- Hayakawa, N., Noguchi, M., Takeshita, S., Eviryanti, A., Seki, Y., Nishio, H., Yokoyama, R., Shuto, M., Shima, Y., Kuribayashi, K., *et al.* (2014). Structure-activity relationship study, target identification, and pharmacological characterization of a small molecular IL-12/23 inhibitor, APY0201. *Bioorg Med Chem* **22**, 3021–3029.
- Hide, T., Takezaki, T., Nakatani, Y., Nakamura, H., Kuratsu, J., and Kondo, T. (2009). Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. *Cancer Res* **69**, 7953–7959.
- Jang, H., Kim, T.W., Yoon, S., Choi, S.Y., Kang, T.W., Kim, S.Y., Kwon, Y.W., Cho, E.J., and Youn, H.D. (2012). O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* **11**, 62–74.
- Kamachi, Y., and Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* **140**, 4129–4144.
- Kaneko, S., Nakatani, Y., Takezaki, T., Hide, T., Yamashita, D., Ohtsu, N., Ohnishi, T., Terasaka, S., Houkin, K., and Kondo, T. (2015). Ceacam1L Modulates STAT3 Signaling to Control the Proliferation of Glioblastoma-Initiating Cells. *Cancer Res* **75**, 4224–4234.
- Kondo, T. (2006). Brain cancer stem-like cells. *Eur J Cancer* **42**, 1237–1242.
- Kondo, T., and Raff, M. (2000). The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J* **19**, 1998–2007.
- Koundinya, M., Sudhalter, J., Courjaud, A., Lionne, B., Touyer, G., Bonnet, L., Menguy, I., Schreiber, I., Perrault, C., Vougier, S., *et al.* (2018). Dependence on the Pyrimidine Biosynthetic Enzyme DHODH Is a Synthetic Lethal Vulnerability in Mutant KRAS-Driven Cancers. *Cell Chem Biol* **25**, 705–717 e711.
- Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L., and Rich, J.N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* **29**, 1203–1217.

- Mazzio, E., Badisa, R., Mack, N., Deiab, S., and Soliman, K.F. (2014). High throughput screening of natural products for anti-mitotic effects in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Phytother Res* *28*, 856-867.
- Ohtsu, N., Nakatani, Y., Yamashita, D., Ohue, S., Ohnishi, T., and Kondo, T. (2016). Eval Maintains the Stem-like Character of Glioblastoma-Initiating Cells by Activating the Noncanonical NF-kappaB Signaling Pathway. *Cancer Res* *76*, 171-181.
- Sayat, R., Leber, B., Grubac, V., Wiltshire, L., and Persad, S. (2008). O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res* *314*, 2774-2787.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., and Dirks, P.B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* *23*, 7267-7273.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., *et al.* (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* *10*, 459-466.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., *et al.* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* *352*, 987-996.
- Sykes, D.B., Kfoury, Y.S., Mercier, F., Wawer, M., Schajnovitz, A., Meyer, H., Pierce, K.A., Stoeckigt, D., Clish, C.B., Clemons, P.A., *et al.* (2016a). Inhibition of the Enzyme Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* *128*.
- Sykes, D.B., Kfoury, Y.S., Mercier, F.E., Wawer, M.J., Law, J.M., Haynes, M.K., Lewis, T.A., Schajnovitz, A., Jain, E., Lee, D., *et al.* (2016b). Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Cell* *167*, 171-186 e115.
- Terawaki, S., Chikuma, S., Shibayama, S., Hayashi, T., Yoshida, T.,

- Okazaki, T., and Honjo, T. (2011). IFN- α directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J Immunol* *186*, 2772-2779.
- Tsukamoto, Y., Ohtsu, N., Echizenya, S., Otsuguro, S., Ogura, R., Natsumeda, M., Isogawa, M., Aoki, H., Ichikawa, S., Sakaitani, M., *et al.* (2016). Chemical Screening Identifies EUrl as a Novel Inhibitor Against Temozolomide-Resistant Glioblastoma-Initiating Cells. *Stem Cells* *34*, 2016-2025.
- Vescovi, A.L., Galli, R., and Reynolds, B.A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* *6*, 425-436.
- White, R.M., Cech, J., Ratanasirintrao, S., Lin, C.Y., Rahl, P.B., Burke, C.J., Langdon, E., Tomlinson, M.L., Mosher, J., Kaufman, C., *et al.* (2011). DHODH modulates transcriptional elongation in the neural crest and melanoma. *Nature* *471*, 518-522.
- Yamashita, D., Kondo, T., Ohue, S., Takahashi, H., Ishikawa, M., Matoba, R., Suehiro, S., Kohno, S., Harada, H., Tanaka, J., *et al.* (2015). miR340 suppresses the stem-like cell function of glioma-initiating cells by targeting tissue plasminogen activator. *Cancer Res* *75*, 1123-1133.
- Yang, X., and Qian, K. (2017). Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* *18*, 452-465.