

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293322

研究課題名(和文)ドラッグリポジショニングによる悪性グリオーマに対する新規化学療法の基盤構築

研究課題名(英文) Drag repositioning for malignant glioma targeting glioma stem cells

研究代表者

中田 光俊 (Nakada, Mitsutoshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20334774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では悪性グリオーマ発生の根幹をなすグリオーマ幹細胞に対して抗腫瘍効果を有する薬剤を1,300種類の既存医薬品の中から探索した。グリオーマ幹細胞に対する増殖抑制効果をスクリーニングした後に既報告薬剤および臨床試験済薬剤を除外した。絞られた候補薬剤の中で、分子量が小さく抗精神病薬として使用されているfluspirileneに着目した。Fluspirileneはグリオーマ幹細胞形質を濃度依存性に阻害し、グリオーマ細胞株の増殖、浸潤を濃度依存性に抑制した。さらにマウスモデルにおいて腫瘍の形成、増殖、浸潤を抑制した。以上よりfluspirileneは有用な抗グリオーマ薬と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Glioma stem cell (GSC)-targeted therapy is a promising approach to treat patients with glioblastoma (GBM). Here, we identified fluspirilene, a traditional antipsychotic drug, as a GSC-targeting agent, selected from thousands of existing drugs with the purpose of drug repositioning. We initially screened drug libraries for small-molecule compounds showing a greater efficacy in inhibiting the proliferation and survival of different GSC lines. Drugs already reported to show therapeutic effects against GBM or those under clinical trials were excluded from subsequent screening. Among the candidate drugs, fluspirilene demonstrated a significant inhibitory effect on the proliferation and invasion of glioma cells as well as in the model mice treated with the drug. These effects were associated with the inactivation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Redeveloping of fluspirilene is a promising approach for the treatment of GBM.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：グリオーマ 幹細胞 ドラッグリポジショニング

1. 研究開始当初の背景

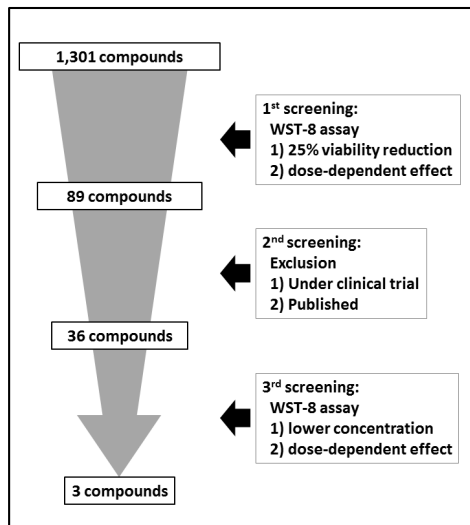
悪性グリオーマは脳原発悪性腫瘍である。最悪性の膠芽腫を放置した場合の生存期間は半年以内とされ、開頭手術による腫瘍摘出術に加え放射線化学療法を行っても多くの場合その生存期間は2年を越えない。悪性グリオーマは人類に残されたもっとも悪性の腫瘍の一つであり、本疾患の克服は医学上の重要課題である。悪性グリオーマは周囲の正常脳に対して浸潤性に増殖する特徴があり、ヒトとしての高次機能を司る脳という臓器の特質を踏まえた時、手術で全部摘出することは不可能である。とりわけ本腫瘍の予後を改善させるには新たな化学療法の確立が急務であると言える。

2. 研究の目的

本研究は悪性グリオーマ発生の根幹をなすグリオーマ幹細胞に対して抗腫瘍効果を有する薬剤を約1,300種類の既存医薬品の中から探索し、悪性グリオーマに対する安全で効果的な化学療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

米国食品医薬品局承認薬剤640種類、生理活性物質480種類、キナーゼ阻害剤80種類、脂肪酸薬68種類、ホスファターゼ阻害剤33種類からなる1,301種類の既存薬剤を使用した。1次スクリーニングとしてグリオーマ幹細胞に対する増殖抑制効果を非接着384穴プレートを用いたWST増殖アッセイにより評価した。2次スクリーニングとしてPubMedや関連Websiteの検索から既報告薬剤および臨床試験済薬剤を除外した。3次スクリーニングとして低濃度候補薬剤によるグリオーマ幹細胞の増殖抑制効果を確認した。絞られた3種類の候補薬剤の中で、分子量が小さく抗精神病薬として使用されている fluspirilene に注目して *in vitro*, *in vivo* での検証実験を行った。3種類のグリオーマ幹細胞株 (KGS01, TGS01, TGS04) を使用して sphere forming assay による幹細胞形質阻害効果を、4種類のグリオーマ細胞株 (U251, SNB19, T98, U87) を使用して増殖、浸潤アッセイを行った。さ

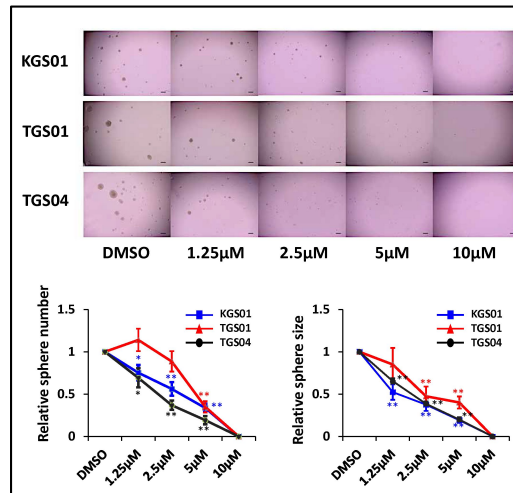


らにグリオーマ幹細胞をマウス脳内に移植したモデル動物に対して治療実験を行った。

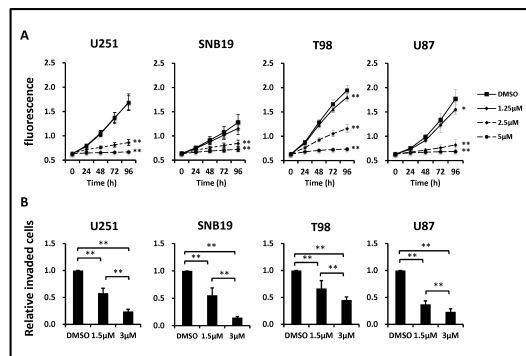
4. 研究成果

(1) 一次スクリーニングで89種類、二次スクリーニングで36種類、検証実験にて3種類の薬剤(特願2015-095019)に絞られた(左下図)。うち、効果の高い fluspirilene を選択した。Fluspirilene は低分子量の抗精神病薬剤で古くに開発された安価な薬剤である。

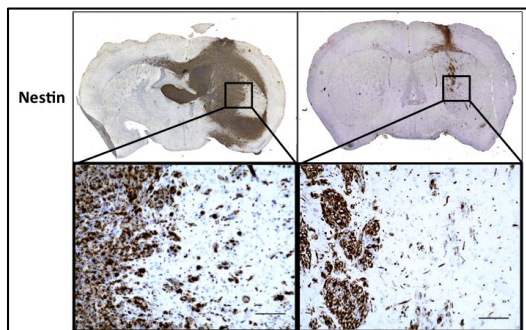
(2) Sphere forming assay の結果、Fluspirilene は3種類のグリオーマ幹細胞形質を濃度依存的に阻害した(下図)。



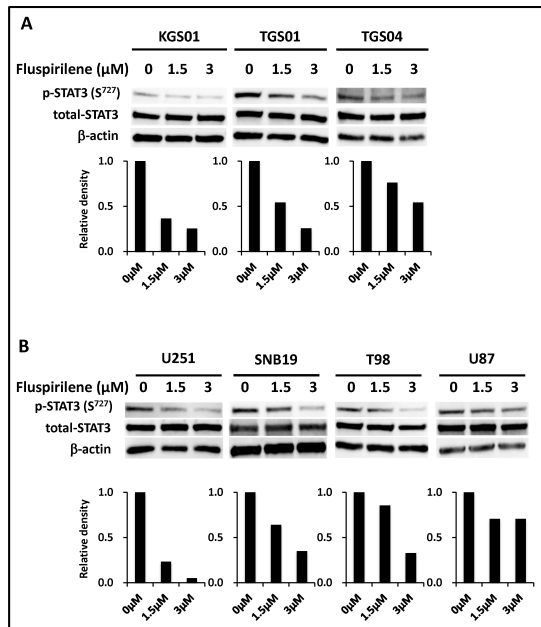
(3) *In vitro* 増殖、浸潤アッセイの結果、fluspirilene は4種類のグリオーマ細胞株に対する増殖(下図A)・浸潤(下図B)抑制効果を示した。



(4) マウス膠芽腫モデルを使用した治療実験では、脳内の腫瘍の形成、増殖、浸潤を抑制した(下図 左: control、右: 薬剤投与群)。



(5) Fluspirilene 処理によるグリオーマ細胞内の増殖シグナル・浸潤シグナル分子の変化を *in vitro* で観察した結果、fluspirilene は幹細胞性維持に関与する Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT) 3 のリン酸化を濃度依存性に抑制した (下図 A: グリオーマ幹細胞株、B: グリオーマ細胞株)。



(6) 膠芽腫モデルで得られた腫瘍組織の薄切切片を用いた免疫染色により、fluspirilene 投与で STAT3 のリン酸化が阻害されることを証明した。

以上のことから、fluspirilene はグリオーマ幹細胞及びグリオーマ細胞の両者に対して抗腫瘍効果を有する薬剤であり、その分子機構として STAT3 のリン酸化抑制作用が関与していると考えられた。

今後、さらなる動物実験と薬剤投与に伴う細胞内シグナル変化の解明により薬理効果の基礎基盤を固め、医師主導の臨床試験を行いたいと考えている。

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 17 件)

Furuta T, Sabit H, Yu D, Miyashita K, Kinoshita M, Uchiyama N, Hayashi Y, Hayashi Y, Minamoto T, Nakada M

Biological basis and clinical trial of glycogen synthase kinase-3 β -targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma.

Oncotarget 2017 Apr 4;8(14):22811-22824.

doi: 10.18632/oncotarget.15206. 査読有

中田光俊

脳腫瘍に対するドラッグリポジショニング研究

Neuro-Oncology の進歩 23-3: 1-8, 2016 査読有

Kinoshita M, Miyashita K, Tsutsui T, Furuta T, Nakada M

Critical neural networks in awake surgery for gliomas.

Neurol Med Chir (Tokyo) 56: 674-686, 2016 査読有

Uno T, Kinoshita M, Furuta T, Miyashita K, Sabit H, Nakada M

Volumetric growth analysis of an insular dysembryoplastic neuroepithelial tumor over a 10-year follow-up.

Surg Neurol Int. 7 (Suppl 44): S1154-1157, 2016 doi: 10.4103/2152-7806.196931. 査読有

Joy A, Kapoor M, Georges J, Butler L, Chang Y, Li C, Crouch A, Smirnov I, Nakada M, Hepler J, Marty M, Feuerstein BG

The role of AKT isoforms in glioblastoma: AKT3 delays tumor progression.

J Neurooncol. 130: 43-52, 2016 査読有

Domoto T, Pyko IV, Furuta T, Miyashita K, Uehara M, Shimasaki T, Nakada M, Minamoto T
Glycogen synthase kinase-3 β is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy.

Cancer Sci. 107: 1363-1372, 2016

doi: 10.1111/cas.13028. 査読有

Ogasawara S, Fujii Y, Kaneko MK, Oki H, Sabit H, Nakada M, Suzuki H, Ichimura K, Komori T, Kato Y

Establishment of anti-human ATRX monoclonal antibody AMab-6.

Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 35: 254-258, 2016 査読有

Takino T, Nakada M, Li Z, Yoshimoto T, Domoto T, Sato H

Tip60 regulates MT1-MMP transcription and invasion of glioblastoma cells through NF- κ B pathway.

Clin Exp Metastasis 33: 45-52, 2016 査読有

Sakr M, Takino T, Sabit H, Nakada M, Li Z, Sato H

miR-150-5p and miR-133a suppress glioma cell proliferation and migration through targeting membrane-type-1 matrix metalloproteinase.

Gene 587: 155-62, 2016

doi: 10.1016/j.gene.2016.04.058. 査読有

Yoneyama T, Watanabe T, Kagawa H, Hayashi Y, Nakada M

Fluorescence intensity and bright spot analyses using confocal microscope for photodynamic diagnosis of brain tumors.

Photodiagnosis Photodyn Ther. 17: 13-21, 2016
doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.11.002. 査読有

Nanjo S, Ebi H, Arai S, Takeuchi S, Yamada T, Mochizuki S, Okada Y, Nakada M, Murakami T, Yano S

High efficacy of third generation EGFR inhibitor AZD9291 in a leptomeningeal carcinomatosis model with EGFR-mutant lung cancer cells.

Oncotarget 7: 3847-3856, 2016
doi: 10.18632/oncotarget.6758 査読有

Ueda F, Aburano H, Ryu Y, Yoshie Y, Nakada M, Hayashi Y, Matsui O, Gabata T

MR spectroscopy to distinguish between supratentorial intraventricular subependymoma and central neurocytoma.

Magn Reson Med Sci. [Epub ahead of print] Dec 12. 2016 査読有

Kim SH, Ezhilarasan R, Chhipa R, Ladner K, Phillips E, Sparks A, Taylor D, Furuta T, Sabit H, Kurozumi K, Kuroiwa T, Akio A, Gallego-Perez I D, Sulman EP, Cheng S, Lee J, Nakada M, Guttridge D, DasGupta B, Goidts V, Bhat KP, Walker J, Nakano I

Serine/Threonine kinase MLK4 determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NFkB-dependent manner.

Cancer Cell 29: 201-213, 2016
doi: 10.1016/j.ccell.2016.01.005. 査読有

Kinoshita M, Nakajima R, Shinohara H, Miyashita K, Tanaka S, Okita H, Nakada M, Hayashi Y

Chronic spatial working memory deficit associated with the superior longitudinal fasciculus: a study using voxel-based lesion-symptom mapping and intraoperative direct stimulation in the right prefrontal glioma surgery.

J Neurosurg 125: 1024-1032, 2016 査読有

Tsutsui T, Miyashita K, Sabit H, Fukui I, Hayashi Y, Mizokami A, Ikeda H, Nagatani H, Nakada M

Acute progression of recurrent meningioma during luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment for prostate cancer.

World Neurosurgery 91: 670.e1-6, 2016
doi: 10.1016/j.wneu.2016.03.076. 査読有

Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MAE, Hayashi Y, Hamada JI, Hirao A

Strong therapeutic potential of γ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and

CD133-low glioblastoma initiating cells.

J Neurooncol 121: 239-250, 2015
doi: 10.1007/s11060-014-1630-z. 査読有

Chikano Y, Domoto T, Furuta T, Sabit H, Kitano-Tamura A, Pyko IV, Takino T, Sai Y, Hayashi Y, Sato H, Miyamoo KI, Hamada JI, Nakada M, Minamoto T

Glycogen synthase kinase 3 β sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1 and c-Jun N-terminal kinase-mediated pathway.

Mol Cancer Ther 14: 564-574, 2015
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0479. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

中田光俊, 董宇、北林朋宏、淑瑠へムラサビット、古田拓也、平尾敦

既存薬による膠芽腫に対する新規化学療法
第 34 回日本脳腫瘍学会, 平成 28 年 12 月 4 日-6 日,
甲府富士屋ホテル(甲府)

Nakada M, Dong Y, Kitabayashi Y, Sabit H, Furuta T, Hirao A

Drug repositioning targeting glioma stem cells.
Society for Neuro-Onology 21st Annual Meeting 2016,

November 17-20, 2016, Scottsdale, Arizona, USA

Scottsdale Fairmont Princess Hotel

中田光俊
脳腫瘍に対するドラッグリポジショニングの試み(特別講演)

第 9 回香川県脳腫瘍学術講演会, 平成 28 年 10 月 28 日,
ホテルクレメント高松(高松)

中田光俊, 董宇、北林朋宏、淑瑠へムラサビット、古田拓也、平尾敦

既存薬の応用による膠芽腫に対する新規化学療法

第 75 回日本脳神経外科学会総会, 平成 28 年 9 月 29 日-10 月 1 日,
福岡国際会議場・福岡サンパレス・マリメッセ福岡(福岡)

Nakada M, Dong Y, Kitabayashi Y, Sabit H, Furuta T, Hirao A

Screening of existing drugs to target glioma stem cells.

13th Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) Meeting,

September 11-14, 2016, Sydney, Australia
Sheraton on the Park

中田光俊, 董宇、北林朋宏、淑瑠へムラサビット、古田拓也、平尾敦

グリオーマ幹細胞を標的とした新規化学療

法の開発（シンポジウム）
第 74 回日本脳神経外科学会総会，
平成 27 年 10 月 14 日-16 日，
ロンドン札幌（札幌）

中田光俊
既存薬スクリーニングによる悪性グリオーマ治療薬の探索（特別講演）
第 9 回奈良脳腫瘍研究会，
平成 27 年 10 月 9 日，
スイスホテル南海大阪（大阪）

董宇，北林朋宏，古田拓也，平尾敦，中田光俊
Existing approved drug with anti-glioma effect and drug safety test in vivo.
第 16 回日本分子脳神経外科学会，
平成 27 年 8 月 28 日-29 日，
アクトシティ浜松コンgresセンター（浜松）

中田光俊
既存医薬品による悪性グリオーマ新規治療法の開発（特別講演）
第 26 回熊本脳神経外科夏季セミナープログラム，
平成 27 年 8 月 1 日，
阿蘇医療センター（熊本）

中田光俊
抗悪性グリオーマ作用を有する既存薬剤のスクリーニング（特別講演）
第 21 回北海道脳腫瘍治療研究会，
平成 27 年 6 月 27 日，
日本生命札幌ビル（札幌）

中田光俊
既存薬剤を使用する悪性グリオーマの化学療法（特別講演）
第 19 回新潟脳腫瘍研究会，
平成 27 年 6 月 19 日，
朱鷺メッセ（新潟）

中田光俊
ドラッグ・リポジショニングによる悪性脳腫瘍に対する新規化学療法（基調講演）
第 1 回先端脳腫瘍治療シンポジウム，
平成 27 年 6 月 10 日，
トラストシティカンファレンス（仙台）

中田光俊
既存薬剤を使用した悪性グリオーマの新たな治療戦略（特別講演）
脳腫瘍治療セミナー，
平成 27 年 6 月 5 日，
新宿 NS ビル（東京）

中田光俊
脳腫瘍学におけるドラッグリポジショニング（特別講演）

第 10 回脳腫瘍の基礎シンポジウム，
平成 27 年 4 月 25 日，
日本大学病院（東京）

中田光俊，董宇，北林朋宏，古田拓也，宮下勝吉，木下雅史，平尾敦，林裕
グリオーマ幹細胞に対して抗腫瘍効果を有する既存医薬品の探索
第 32 回日本脳腫瘍学会，
平成 26 年 11 月 30 日-12 月 2 日，
シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル（千葉）

中田光俊
ドラッグリポジショニングによる膠芽腫に対する新規化学療法（招聘講演）
Temozolomide Forum in HIROSHIMA 2014，
平成 26 年 11 月 7 日，
ホテルグランヴィア広島（広島）

中田光俊，董宇，北林朋宏，古田拓也，平尾敦，林裕
ドラッグリポジショニングを指向したグリオーマ幹細胞に対する既存薬剤スクリーニング（シンポジウム）
第 73 回日本脳神経外科学会総会，
平成 26 年 10 月 9 日-11 日，
グランドプリンスホテル新高輪（東京）

董宇，中田光俊，北林朋宏，古田拓也，平尾敦，林裕
Screening of existing approved drugs for inhibiting glioma stem cell proliferation
第 15 回日本分子脳神経外科学会，
平成 26 年 9 月 25 日-26 日，
大手門パルズ（山形）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：脳腫瘍治療組成物
発明者：中田光俊、平尾敦
権利者：金沢大学
種類：特願
番号：2015-095019
出願年月日：平成 27 年 5 月 7 日

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://neurosurgery.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織
(1)研究代表者

中田 光俊 (NAKADA, Mitsutoshi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：20334774

(2) 連携研究者

平尾 敦 (HIRAO, Atsushi)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号：9034350

(3) 連携研究者

源 利成 (MINAMOTO, Toshinari)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号：50239323

(4) 研究協力者

董宇 (DONG, Yu)
古田拓也 (FURUTA, Takuya)
淑瑠へムラサビット (SABIT, Hemragul)
北林朋宏 (KITABAYASHI, Tomohiro)