

氏名 (生年月日) あんどう しょうた
安藤 翔太 (1994年11月2日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第221号

学位授与の日付 2023年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 アセトゲニン誘導体 JCI-20679 による膠芽腫細胞に対する増殖抑制機構の
解明

論文審査委員 (主査) 准教授 中田 晋

(副査) 教授 西口 工司

(副査) 教授 中田 徹男

論文内容の要旨

序章 (はじめに)

膠芽腫は、成人発症の原発性悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く予後が不良な疾患である。外科療法、放射線療法、化学療法などの標準的な治療が可能な患者における生存期間中央値は14.6ヶ月前後であり、新たな治療戦略の開発が必要である。膠芽腫の予後が不良な原因の1つに、標準治療薬テモゾロミドに対する抵抗性が報告されており、これを克服する手法の確立が必要である。近年、新しい作用機序の抗悪性腫瘍薬として、ミトコンドリア阻害剤の報告がなされている。天然物由来アセトゲニン類から合成展開されたJCI-20679は、ミトコンドリア複合体Iの阻害活性を有し、抗腫瘍効果を発揮することが報告されているが、膠芽腫細胞に対する有効性は検証されておらず、その増殖抑制機構に関しても不明な点が多い。本研究では、JCI-20679による膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果について評価し、そのメカニズムを明らかにするとともに、テモゾロミドとの併用による有効性に関して検討を行った。

第1章 膠芽腫幹細胞に対するJCI-20679の増殖抑制効果と作用機序の解明

本章では、種々の条件で膠芽腫細胞および膠芽腫幹細胞に、JCI-20679を作用させ増殖抑制効果を評価した。その結果、単一のマウスモデル膠芽腫組織から樹立した、血清負荷により分化を誘導した接着系培養で維持した膠芽腫細胞 (IC₅₀ 421.7 nM) と比較して、ニューロスフェア法で維持した膠芽腫幹細胞 (IC₅₀ 47.3 nM) に対して、より低濃度で増殖抑制効果を示すことを明らかにした。JCI-20679を膠芽腫幹細胞に作用させると、酸化的リン酸化を含むミトコンドリア機能の阻害によるエネルギー代謝ストレスの指標となるAMP/ATP比の上昇と、AMPKのリン酸化による活性化が誘導されることをみいだした。ミトコンドリア機能阻害の下流因子について探索したところ、膠芽腫の浸潤や転移に関与することが報告されているNFATc2の発現量を、JCI-20679処理が低下させることをみいだした。AMPKをノックダウンすると、JCI-20679による増殖抑制効果とNFATc2のmRNA発現量の低下が一部回復したことから、AMPKの活性化がJCI-20679の作用機序に関与することを示した。さらにNFATc2の強制発現によりJCI-20679による増殖抑制効果が有意に回復することを明らかにし、NFATc2の発現

低下が JCI-20679 の作用機序に関与することを示した。最後に、膠芽腫幹細胞の同所性移植膠芽腫モデルマウスにおいて、JCI-20679 の腹腔内投与は、生体内イメージングによる luciferase 活性の評価において有意な抗腫瘍効果と生存期間の延長効果 ($P < 0.01$) を示した。

第2章 JCI-20679 とテモゾロミドの併用による増殖抑制効果と作用機序の解析

本章では、膠芽腫細胞のテモゾロミドに対する抵抗性を克服する手法の確立をめざし、前章で明らかにしたテモゾロミドとは異なる作用機序をもつ JCI-20679 を併用することによる、抗腫瘍効果の評価と作用増強メカニズムの解析を行なった。JCI-20679 とテモゾロミドを併用すると、種々の膠芽腫細胞に対して増殖抑制効果の増強効果を示した。Isobologram 解析を用いて併用効果を検証したところ、75% effective doses (ED75) の濃度において JCI-20679 とテモゾロミドの併用は、ヒト膠芽腫細胞およびマウス由来膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果において有意な相乗効果を示した (combination index 0.549-0.570)。過去の報告において、膠芽腫細胞のテモゾロミドに対する抵抗性には、細胞保護的なオートファジーの誘導が関与することが報告されていた。そこで JCI-20679 のオートファジーに対する影響を解析したところ、オートファジーのマーカーである LC3-II タンパク質の発現量が低下することを明らかにした。また、テモゾロミドを処理することで増加する LC3-II タンパク質の発現量が、JCI-20679 の併用により低下することを実証した。さらに、テモゾロミド抵抗性を伴うオートファジー誘導に依存して細胞内 ATP が増加することが報告されていたが、JCI-20679 を併用することにより、この効果が打ち消されることを明らかにした。これらの結果は、JCI-20679 がテモゾロミドにより誘導される細胞生存を促進するオートファジーを阻害して、その増殖抑制効果を増強することを示唆している。最後に、ヒト膠芽腫 U87MG 細胞を同所性移植し作成した膠芽腫モデルマウスに JCI-20679 とテモゾロミドを投与したところ、それぞれ単独では抗腫瘍効果を示さない投与量を併用することにより、生体内イメージングによる luciferase 活性の評価において有意な抗腫瘍効果を示すことを実証した。これらの結果から、JCI-20679 は、テモゾロミドの膠芽腫に対する治療効果を増強し、その抵抗性克服に有用である可能性が示唆された。

総括 (結論)

本研究では、JCI-20679 が膠芽腫細胞に対してミトコンドリア機能の阻害作用を発揮し、増殖抑制効果を示すことを明らかにした。またその作用機序として AMPK の活性化および NFATc2 の発現量の低下が関与していることを明らかにした。さらに JCI-20679 は生体内膠芽腫モデルに対して抗腫瘍効果を発揮することを示した。JCI-20679 は、既存の抗がん剤であるテモゾロミドとの併用により、膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果を増強し、それぞれ ED75 の濃度において有意な相乗効果を示すことを明らかにした。この効果増強のメカニズムとして、テモゾロミドの治療抵抗性を惹起するオートファジーの誘導を、JCI-20679 が阻害することにより増殖抑制効果が増強されている可能性が示唆された。また生体内膠芽腫モデルにおいても JCI-20679 の併用は、テモゾロミドの抗腫瘍効果を増強した。これらの本研究の成果は、アセトゲニン誘導体 JCI-20679 が、膠芽腫の治療およびそのテモゾロミドの治療抵抗性の克服に有用であり、膠芽腫の治療成績の向上に寄与する可能性があることを示している。

審査の結果の要旨

《緒言》

膠芽腫は、成人発症の原発性悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、その生存期間中央値は14.6ヶ月前後と予後不良であるため、新たな治療戦略の創出が必要である。膠芽腫の予後が不良な原因の1つに、標準治療薬テモゾロミドに対する抵抗性が報告されており、これを克服する手法の確立が望まれる。近年、新しい作用機序の抗悪性腫瘍薬として、ミトコンドリア阻害剤の報告がなされている。天然物由来アセトゲニン類から合成展開されたJCI-20679は、ミトコンドリア複合体Iの阻害活性を有し、抗腫瘍効果を発揮することが報告されているが、膠芽腫細胞に対する有効性は検証されておらず、その増殖抑制機構に関しても不明な点が多い。本研究では、JCI-20679による膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果について評価し、そのメカニズムを明らかにするとともに、テモゾロミドとの併用による効果の増強作用に関して検討を行った。

《審査結果の要旨》

(1) 膠芽腫幹細胞に対する JCI-20679 の増殖抑制効果と作用機序の解明

膠芽腫細胞に対する JCI-20679 の増殖抑制効果を明らかにし、酸化リン酸化を含むミトコンドリア機能の阻害によるエネルギー代謝ストレスの指標となる AMP/ATP 比の上昇と、AMPK のリン酸化による活性化が誘導されることをみいだした。この際、膠芽腫の浸潤や転移に関与する NFATc2 の発現量が、AMPK 活性化に依存して低下することをみだし、また NFATc2 の強制発現により JCI-20679 の増殖抑制効果が有意に回復することを明らかにした。膠芽腫幹細胞の同所性移植膠芽腫モデルマウスに対する JCI-20679 投与は、生体内イメージングによる luciferase 活性の評価において有意な抗腫瘍効果と生存期間の延長効果を示した。

(2) JCI-20679 とテモゾロミドの併用による増殖抑制効果と作用機序の解析

テモゾロミドとは異なる作用機序をもつ JCI-20679 に着目し、JCI-20679 とテモゾロミドを併用による、膠芽腫細胞の増殖抑制効果の相乗的な増強作用を明らかにした。膠芽腫細胞のテモゾロミドに対する抵抗性には、細胞保護的なオートファジーの誘導が関与するため、JCI-20679 のオートファジーに対する影響を解析した。その結果、JCI-20679 がテモゾロミドにより誘導される細胞生存を促進するオートファジーを阻害して、これらの併用により増殖抑制効果を増強することを明らかにした。さらにヒト膠芽腫 U87MG 細胞を同所性移植し作成した膠芽腫モデルマウスを用いた検討により、JCI-20679 は、テモゾロミドの膠芽腫に対する治療効果を増強し、その抵抗性克服に有用である可能性が示された。

《結論》

本研究により、JCI-20679 が膠芽腫細胞に対してミトコンドリア機能の阻害作用を発揮して増殖抑制効果を示すこと、AMPK の活性化および NFATc2 の発現量の低下がその作用機序に関与していることを明らかにした。また、JCI-20679 は生体内膠芽腫モデルに対しても抗腫瘍効果を発揮することを示した。JCI-20679 は、抗がん剤テモゾロミドとの併用により、膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果を増強し、有意な相乗効果を示すことを明らかにした。すなわち、テモゾロミドの治療抵抗性を惹起するオートファジーの誘導を、JCI-20679 が阻害することにより増殖抑制効果が増強されることを明らかにし、生体内膠芽腫モデルにおいても JCI-20679 の併用は、テモゾロミドの抗腫瘍効果を増強した。これらの本研究の成果は、アセトゲニン誘導体 JCI-20679 が、膠芽腫の治療およびそのテモゾロミドの治療抵

抗性の克服に有用であり、膠芽腫の治療成績の向上に寄与する可能性があることを示している。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。