

治療抵抗性下垂体腺腫に対する新規薬剤の探索

(課題番号：187209)

研究期間：2018年4月1日～2019年3月31日

研究責任者：福田 高士

【研究背景】

下垂体はホルモンの中樞であり、下垂体から分泌されるホルモンの不足または過剰は様々な病態を引き起こす。下垂体腺腫はその下垂体に発生する腫瘍である。頭蓋内の腫瘍の中で頻発するものである。下垂体腺腫は発生する下垂体ホルモンによって分類され、ホルモンを産生しない非機能性腺腫、プロラクチン(PRL)産生腺腫、成長ホルモン(GH)産生腺腫などに分類されている。

GH産生腺腫は先端巨大症と呼ばれている。それはGH過剰により様々な症状を示すことが特徴である。GHそのものだけではなくGHの刺激によって肝臓で産生されるインスリン様成長因子1(IGF-1)の高値によって

もたらされる。その症状は特徴的な顔貌変化である下顎の突出や手指の増大を生じ、糖尿病などの代謝異常、寿命の短縮を呈する。その治療は経鼻的下垂体腫瘍摘出術などによる手術療法が中心となって行われている。手術療法が適さない症例や術後の残存腫瘍に対しては薬物療法も行われている。薬物療法としてはソマトスタチンアナログであるオクトレオチドなどが用いられているがその奏効率は十分ではなく半分以下である。下垂体腺腫の多くは散発性に発生するが一部は遺伝性下垂体腺腫もある。遺伝性下垂体疾患の一つとして知られている家族性下垂体腺腫は若年で発症し、腫瘍サイズが大きく、薬物療法に対する抵抗性を認める。このため、既存薬と異なる標的に作用する薬剤の開発が待望されている。

図1. AIPをノックアウトしたGH3とそのホルモン分泌

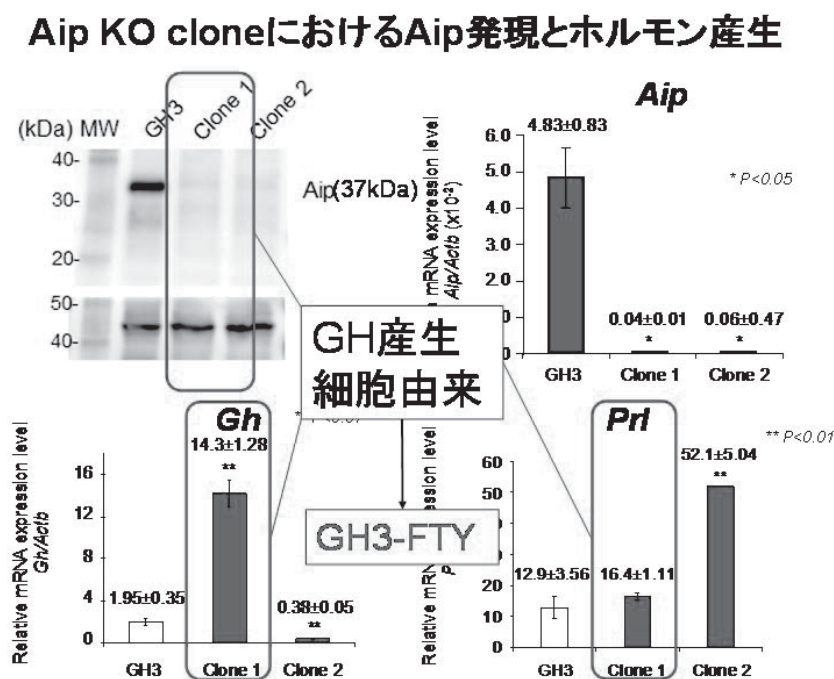


図2. AIP ノックアウト細胞株における GH 分泌能

GH3-FTYにおけるGH産生亢進

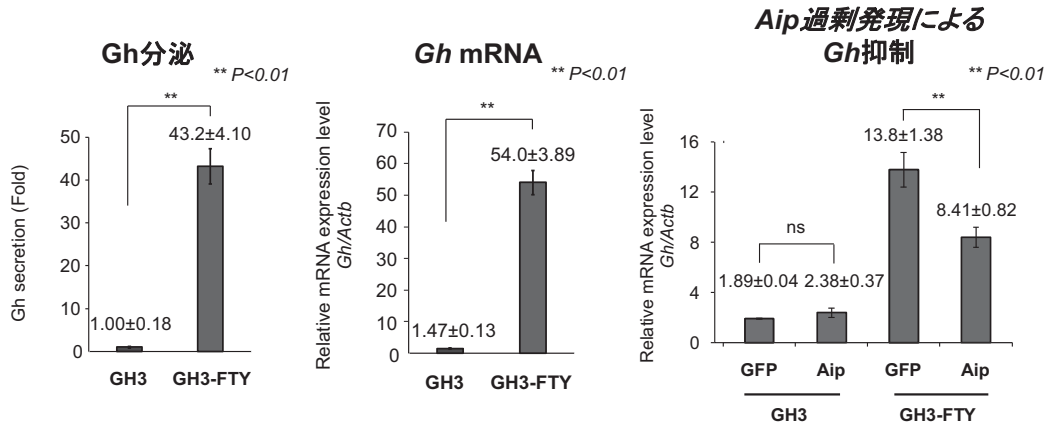
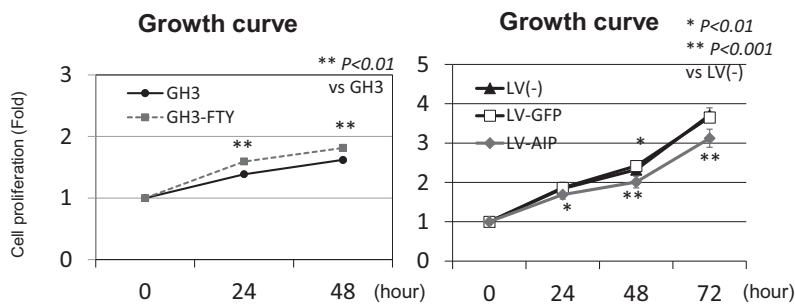
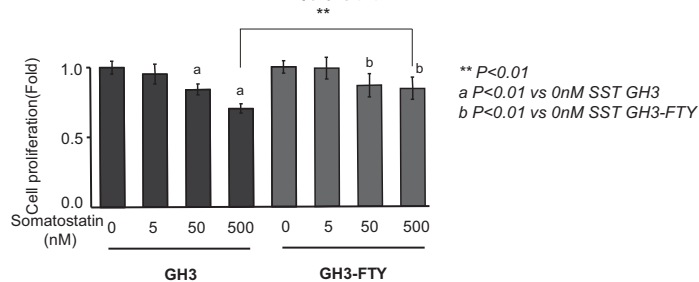


図3. AIP ノックアウト細胞株における細胞増殖能

GH3-FTYにおける細胞増殖



ソマトスタチンによる増殖抑制



申請者はこれまでに、福大病院を受診した GH 産生性下垂体腫瘍患者姉弟例を遺伝子解析し、家族性下垂体腺腫の原因遺伝子の一つである arylhydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) の新規遺伝子変異を見出した。さらに、AIP 変異と GH 産生との関係を明らかにするため、ラット下垂体腫瘍細胞株である GH 3 細胞の Aip 遺伝子をゲノム編集によって機能喪失させた細胞株 (GH 3 -FTY) を樹立した (図 1)。樹立した細胞株は、GH 分泌および細胞増殖能が亢進しており、それはノックアウトした AIP を強制発現することでキャンセルされた (図 2, 図 3)。そしてソマトスタチンに対して抵

抗性を示した (図 3)。治療抵抗性下垂体腺腫のモデルとして有用と考えられた (Fukuda et al, 2016 PLOS One)。作製された細胞株を用いて治療抵抗性下垂体腺腫に対する新規薬剤が探索可能か検討したものが今回の研究である。

【研究計画・方法】

1. Aip を機能喪失した治療抵抗性細胞株である GH 3 -FTY を 96-well plate に播種し、種阻害剤ライブラリー (384種；文部科学省新学術領域研究・癌支援

化学療法基盤支援活動班より供与)を濃度10 μ Mにて投与し、24時間培養する。リアルタイム PCR を用いて Gh の mRNA 発現量を解析する。Gh を抑制する薬剤または細胞死を誘導する薬剤をスクリーニングする。

2. 候補薬剤の濃度および刺激時間の条件を変えて、Gh 抑制作用を検討する。次に、候補薬剤について細胞増殖抑制作用についても検討を行う。同条件下において親株 GH 3 における薬剤の効果が GH 3 -FTY と同等であるか検討する。また、既存薬の Gh 抑制効果との比較を行う。
3. 阻害剤の標的タンパクが GH 産生に関与するかについて明らかにするため、標的タンパクの発現を siRNA にて阻害し、Gh の発現量が低下するか確認する。siRNA の導入は nucleofector を用いて行い、標的遺伝子の発現と Gh の発現量について、リアルタイム PCR とウェスタンブロットにて解析する。また、Aip 欠失細胞株と親株とを比較したマイクロアレイのデータと照らし、標的シグナルの因子が Aip 欠失によって発現変動しているか調べる。

【結果】

1. 384種の中で特に Gh の mRNA の発現を低下させたものを表 1 に示す。DMSO と比較し Jak-2 阻害薬である Cucurbitacin I では0.0445、アクチン重合阻害剤である Cytochalasin D では0.0670まで Gh の mRNA の発現が抑制された(表 1)。次に特に Gh の mRNA の発現が抑制された薬剤を 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M の濃度に分けて再度、Gh の mRNA 発現を確認した。10 μ M よりも低濃度でも Gh mRNA の発現抑制を認めたものは Cucurbitacin I, Cytochalasin D, Lactacystin であった(図 4)。

表 1. Gh 抑制作用を示した阻害剤リスト (上位10種類)

#	Category	Compound	Gh expression ratio to control
1	Jak-2	Cucurbitacin I	0.0445
2	actinfilament	Cytochalasin D	0.0670
3	farnesyltransferase	Manumycin A	0.0723
4	EGFR, topo II	Genistein	0.1134
5	proteosome	Lactacystin	0.1250
6	iNOS	1400W, HCl	0.1397
7	ribonucleotide reductase	Hydroxyurea	0.1446
8	iNOS	AMT, HCl	0.1582
9	DNA methyltransferase	Azacytidine	0.1582
10	MEK	U0126	0.1696

次に細胞死増殖に対する作用について検討した。Cucurbitacin I と Cytochalasin D では有意に細胞増殖が抑制されたが Lactacystin では抑制されなかった。細胞増殖は GH 3 -FTY だけではなくオリジナルの細胞株である GH 3 でも検討したが結果は同様であった(図 5)。

2. 3. については現在、検討中である。

【考察】

今回の研究において明らかになったものは Cucurbitacin I と Cytochalasin D が GH 産生分泌細胞株である GH 3 において Gh の mRNA 発現抑制作用と細胞増殖抑制作用を示したことである。Cucurbitacin I は Jak-2 Stat 3 の阻害剤である。オリジナルの GH 3 だけではなく我々が作成した AIP をロックアウトした GH 3 であり GH 分泌や細胞増殖が亢進し薬剤抵抗性を示した細胞株 (GH 3 -FTY)でも同様の作用を示している。既報において、Stat 3 が GH 産生腫瘍の GH 分泌亢進及び細胞増殖能を

図 4. Gh 抑制作用を示した阻害剤リスト (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M)

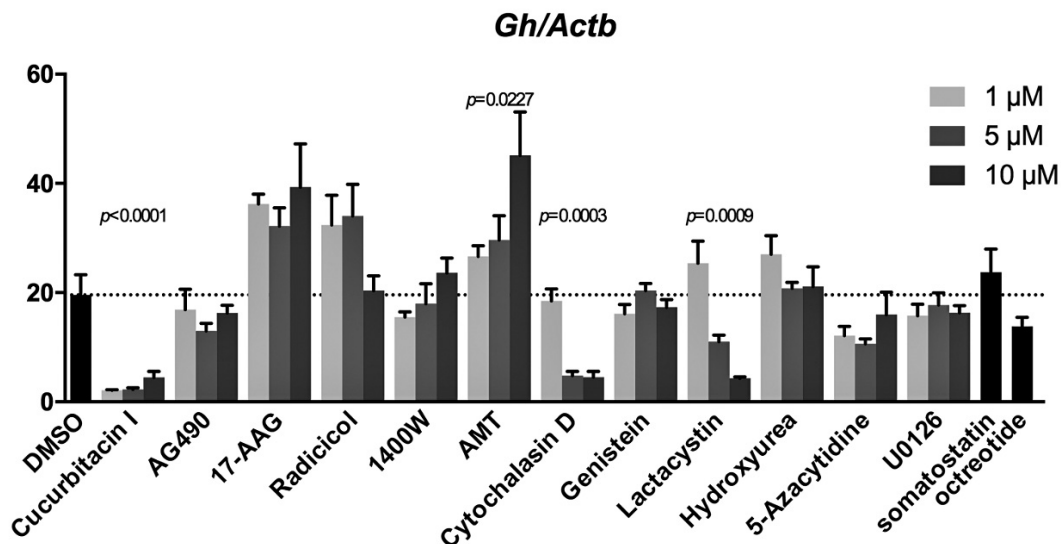
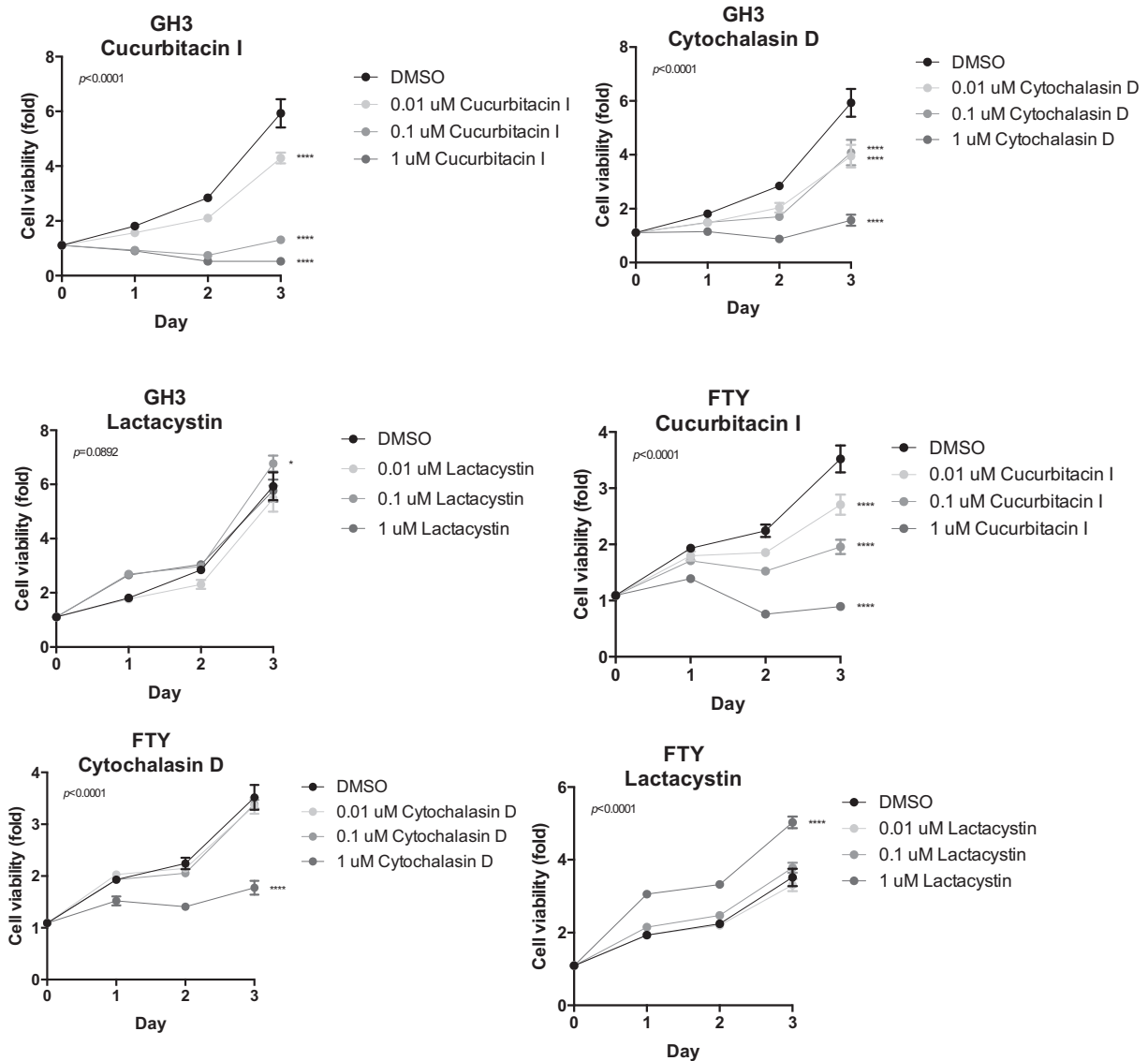
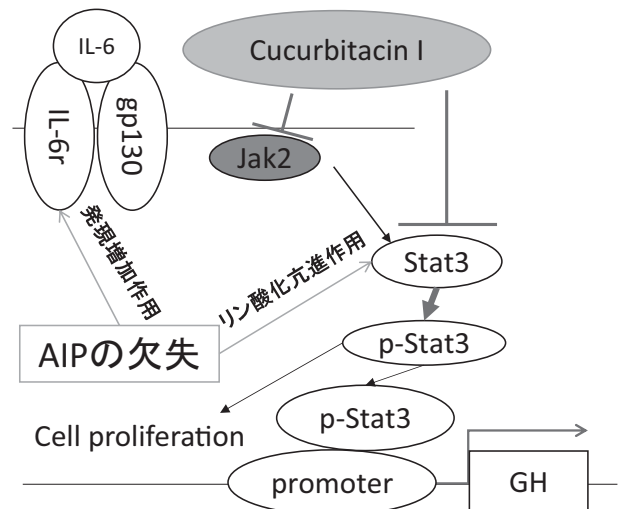


図 5. 細胞増殖に対する作用



亢進することが示されている (J Clin Invest. 2015; 125(4): 1692-1702. doi: 10.1172/JCI 78173)。我々は以前の研究において AIP がノックアウトされた GH 3 -FTY において Stat 3 のリン酸化の亢進があり、それは AIP の強制発現でキャンセルされることを報告した。そのことは AIP のノックアウトが Stat 3 のリン酸化を介し Gh の mRNA 発現亢進や細胞増殖亢進を来していることを示唆した。今回、明らかになったことは Cucurbitacin I により Jak 2 -Stat 3 の経路を阻害することで AIP ノックアウトによってもたらされた変化をキャンセルできる可能性である (図 6)。Cucurbitacin I は骨肉腫を播種させたマウスにおいて抗腫瘍効果を示したという報告もある (Int J Oncol. 2016; 49(6): 2275-2284. doi: 10.3892/ijo.2016.3757)。そのため、今後以前の研究と同様に GH 3 や GH 3 -FTY を播種させた実験系において同様の検討を行い GH 産生下垂体腺腫においても同様の抗腫瘍効果を示すか検討が必要である。Cytochalasin D はアクチン

図 6. AIP ノックアウトによる Stat 3 への影響及び Cucurbitacin I による作用



(Fukuda T, Tanaka T, et al.. PLoS One. 2016;11(10):e0164131.)

の重合阻害剤ではあるが今回の抗腫瘍効果の明らかな機序は不明である。今後の研究で検討していく必要があると考えられた。

【今後の予定】

今後は Cucurbitacin I や Cytochalasin D の細胞増殖能や GH 分泌抑制作用の効果の機序を検討する。そして、BALB/c-nu に対して GH 3 や GH 3 -FTY の腫瘍播種実験を行い、in vivo における Cucurbitacin I や Cytochalasin D の抗腫瘍効果についても検討する予定である。

【学会発表】

第91回日本内分泌学会学術総会, 治療抵抗性 GH 産生腺腫に対する新規薬剤, 2018年 4 月27日