

T-LAK Cell-Originated Protein Kinase (TOPK) inhibitor induces tumor suppression of the growth in xenograft models of human glioma

悪性神経膠腫皮下腫瘍モデルにおけるTOPK阻害剤の腫瘍増大抑制
に関する検討

2019 年度

生命融合科学教育部 博士課程 認知・情動脳科学専攻

学籍番号 31481003

高 正圭

〔目的〕

T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK)はp38MAPKをリン酸化するMAPKキナーゼであり、in vitroにおいて神経前駆細胞では細胞周期依存性に活性化される。TOPKは、精巣や胎児組織以外では正常組織に発現していないものの、数多くの悪性腫瘍に発現し、その予後と相関していることが報告されている。我々のグループは以前にTOPKの発現量と生命予後に相関があること、TOPK阻害剤 (OTS964)が悪性神経膠腫の細胞株の増殖を抑制することを報告した。今回我々の目的は悪性神経膠腫皮下腫瘍モデルを用いてin vivoにおけるOTS964の腫瘍増大抑制効果を明らかにすることである。

〔方法〕

U87悪性神経膠腫細胞を右大腿部に皮下注射し皮下腫瘍モデルを作成した。腫瘍容積が200 mm³に達したモデルに対してOTS964を経口投与することとした。投与群は(1) vehicle群(n=6)、(2) OTS964 25 mg/kg 群(n=6)、(3) OTS964 50 mg/kg 群(n= 10)の3群に分け14日間連日投与した。投与終了後、14日間の観察期間を設け、その後組織学的検討を行うため犠死させ組織を採取した。投与期間中のOTS964における腫瘍への影響を検討すべく、新たにOTS964 25mg/kg (n=3)を設定し、7日間連日投与し、投与後に犠死させ組織を採取した。

〔結果〕

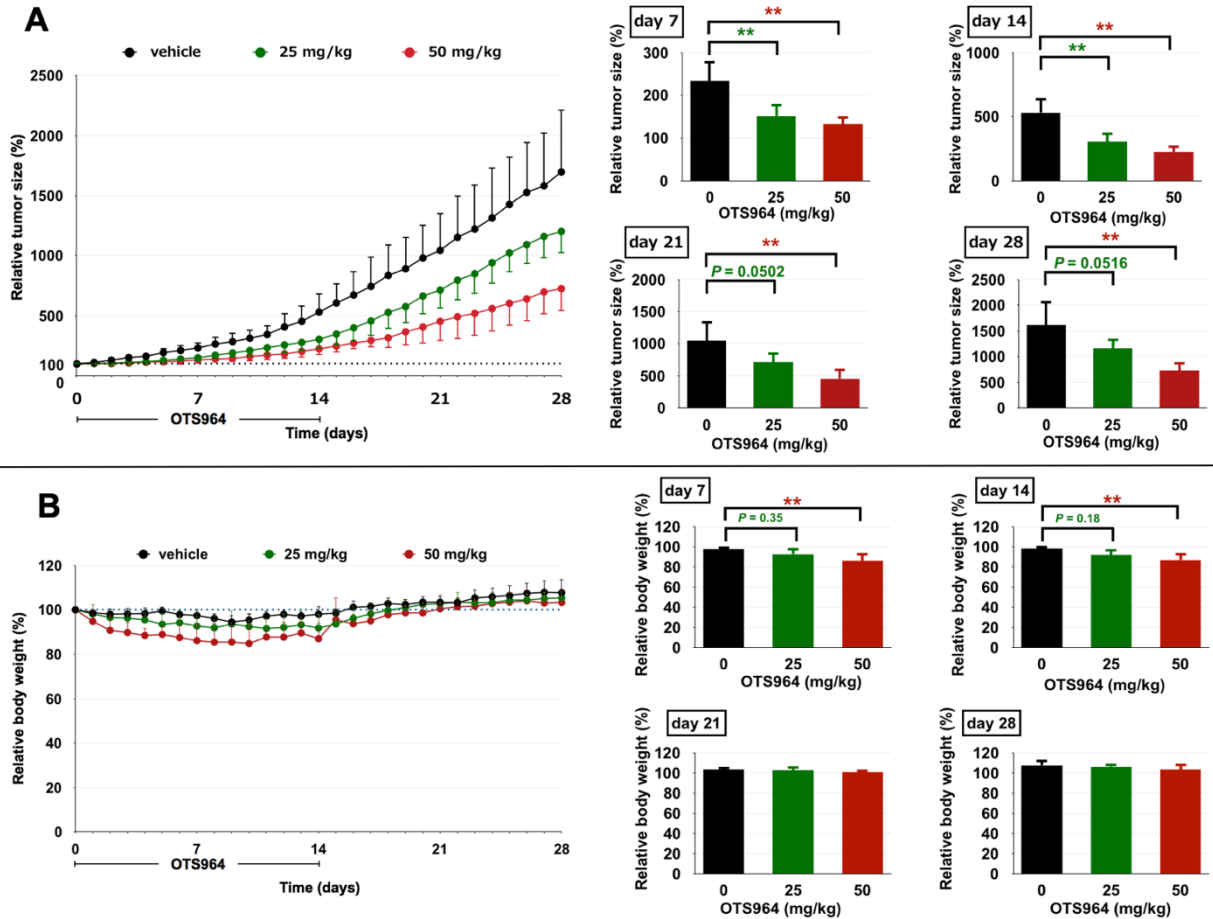
OTS964投与群はそれぞれ腫瘍増大抑制効果を発揮した。投与7日目において、OTS964 25 mg/kg群と50 mg/kg群はvehicle群に比べ有意に増大抑制効果を発揮したが($P<0.01$)、OTS964 25 mg/kg群と50 mg/kg群の間には有意な差がなかった ($P=0.60$)。OTS964投与終了時点においてvehicle群は 531.1 ± 155.6 %の腫瘍増大をきたした一方で、OTS964 25 mg/kg群と50 mg/kg群はそれぞれ 304.6 ± 76.5 %,および 225.4 ± 50.4 %でそれぞれ有意に腫瘍増大抑制効果を発揮していた ($P<0.01$)。OTS964投与終了後、各群とも腫瘍は増大するものの、投与終了14日目においてもOTS964 50 mg/kg群はvehicle群に比べ有意に腫瘍増大が抑制されていた ($P<0.01$) (図1A)。体重モニターの結果、OTS964 50 mg/kg群のみ投与7日目と投与14日目にvehicleに比べ有意に体重減少をきたしていた (それぞれ $P<0.01$)。しかし、投与終了直後から体重増加に転じ、投与終了7日目には各群間で有意差が消失した(図1B)。TOPK染色結果を図2D-Fに示す。TOPK陽性率はvehicle 44.9 ± 3.3 %、OTS964 25 mg/kg 46.8 ± 3.6 %、OTS964 50 mg/kg群 45.4 ± 1.9 %で各群とも同等の陽性率であった (図3A)。リン酸化TOPK染色およびリン酸化histone H3染色結果を図2G-I及び2K-Lに示す。リン酸化TOPKは細胞核周辺に強く染色されその陽性率はvehicle 5.7 ± 0.7 %、OTS964 25 mg/kg 3.4 ± 0.7 %、OTS964 50 mg/kg群 2.6 ± 1.1 %で、OTS964により自己リン酸化が有意に抑制されていた ($P<0.01$ 、図3B)。リン酸化histone H3陽性率はvehicle 4.5 ± 1.0 %、OTS964 25 mg/kg 3.2 ± 0.5 %、OTS964 50 mg/kg群 2.4 ± 0.7 %で自己リン酸化と同様有意にリン酸化が抑制されていた($P<0.01$ 、図3C)。Ki-67染色結果を図2M-O示す。Ki-67陽性率はvehicle 53.9 ± 2.6 %、OTS964 25 mg/kg 40.6 ± 4.6

%、OTS964 50 mg/kg群 35.4±1.9 %でOTS964により腫瘍増殖能が有意に抑制されていた ($P<0.01$ 、**図3D**)。アポトーシス発現変化を検討すべくcleaved caspase-3染色を実施した (**図2P-R**)。陽性率はvehicle 0.5±0.2 %、OTS964 25 mg/kg 0.6±0.2 %、OTS964 50 mg/kg群 0.6±0.2 %であり、3群間に有意差はなかった (**図3E**)。OTS964投与期間中犠死させ組織を採取した群において、TOPK陽性率は他の群と同等である一方で、リン酸化・自己リン酸化は著明に抑制され (**図3B, C**)、Ki-67陽性率も23.7±2.7%と他の3群よりも有意に腫瘍増殖能が抑制されていた。Cleaved caspase-3陽性率は1.1±0.3%でOTS964投与中に腫瘍のアポトーシス誘導を確認した(**図3E**)。

〔総括〕

本研究で、ヒト悪性神経膠腫皮下腫瘍モデルにおいて新規TOPK阻害剤OTS964が腫瘍増大抑制効果を発揮したことを示した。また、免疫組織学的検討により、OTS964はリン酸化・自己リン酸化を抑制し、腫瘍増殖能を抑制していたことを示した。投与期間中、OTS964は腫瘍をアポトーシスに誘導し、腫瘍増大抑制効果を発揮していた。悪性神経膠腫の新たな治療オプションになり得る可能性が示唆された。

図 1. 腫瘍容積と体重の変化に関する統計学的検討結果

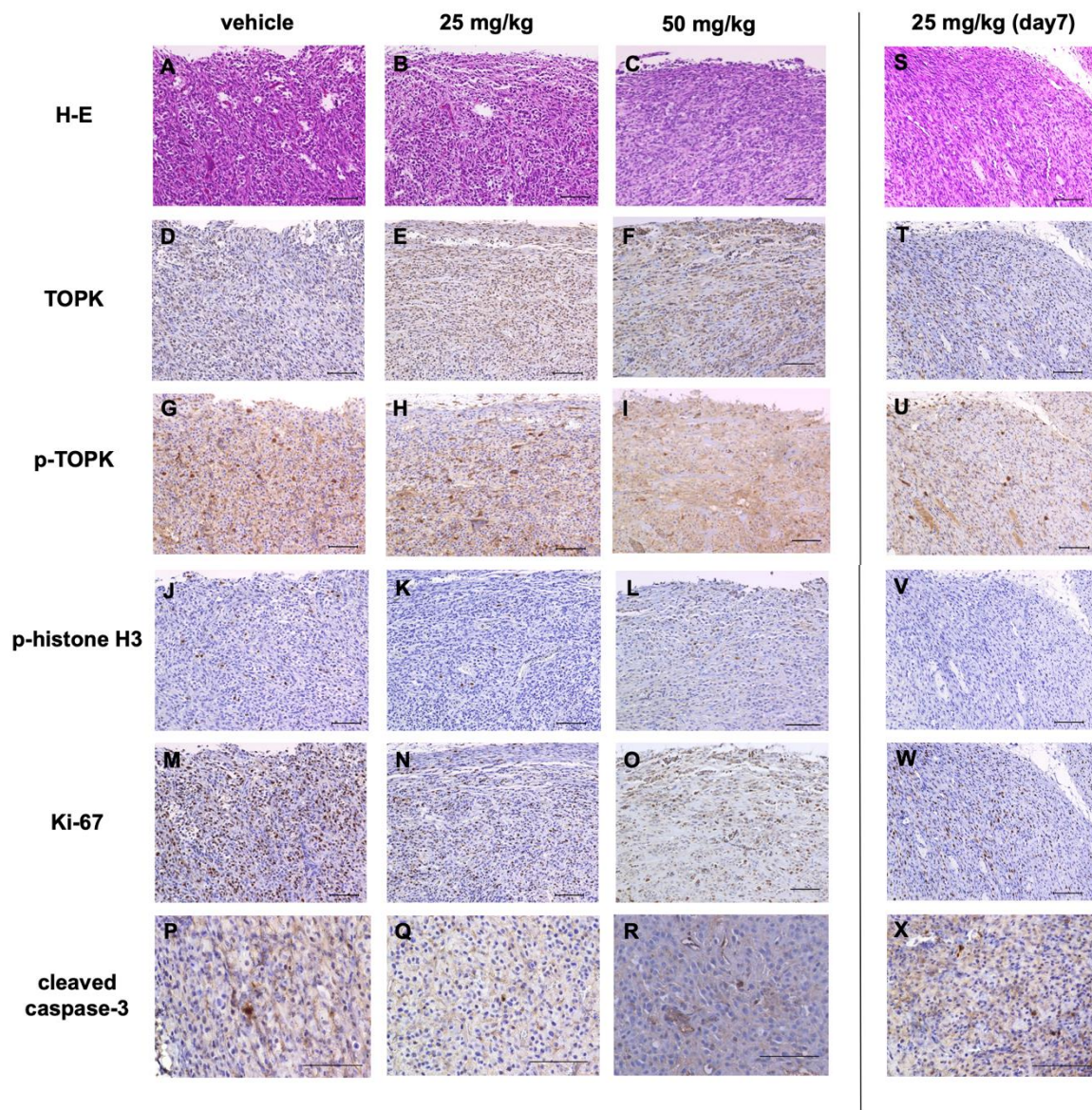


腫瘍サイズと体重は毎日測定計測しグラフ化した。

(A) 平均腫瘍容積±標準偏差 (** $P < 0.01$)

(B) 平均体重±標準偏差 (** $P < 0.01$)

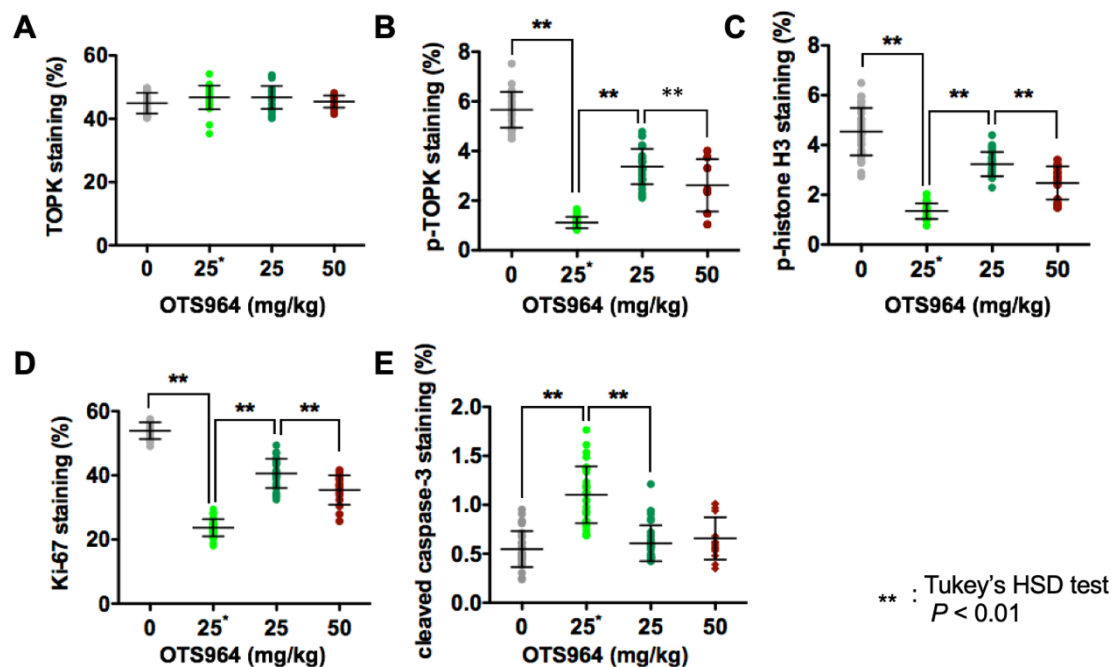
図 2. H-E 染色および各種免疫組織染色所見



OTS964 各投与群の組織と、OTS964 を 7 日間投与し採取した組織を検討した。

A-C および S は H-E 染色、D-F と T は TOPK 染色、G-I および U はリン酸化 TOPK 染色、J-L および V はリン酸化 histone H3 染色、P-R および X は cleaved caspase-3 染色結果である。なお、スケールバーは 100 μ m を示す。

図 3. 各種免疫組織染色における陽性率



各点は関心領域内の陽性細胞率を示し、TOPK 染色 (A)、リン酸化 TOPK 染色 (B)、リン酸化 histone H3 染色 (C)、Ki-67 染色 (D)、cleaved caspase-3 染色 (E)に対し、統計学的に検討した。

25*は OTS964 を 7 日間投与し採取・検討した組織における陽性率を示している。

水平ラインは中央値±標準偏差を表している。