

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591707

研究課題名 (和文) 神経膠腫におけるアルキル化剤の耐性とその克服

研究課題名 (英文) The treatment resistance to alkylating agents in malignant gliomas and strategies to overcome.

研究代表者

吉野 篤緒 (YOSHINO ATSUO)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：50256848

研究成果の概要：悪性星細胞系腫瘍の生存率は悲惨な状況である。そんな中、temozolomide (TMZ) が認可され、大きな役割を持つものと注目されている。しかし、TMZは延命効果を示すものの十分ではなく、また抵抗性が大きな問題である。特にメチル化修復酵素であるMGMTの関与が示唆され、MGMTを抑制・枯渇することで耐性の克服が期待されている。しかし、O⁶-BG、BCNUやPCZを用いた検討では満足すべきものではない。一方、我々は長年にわたりIFN-βに注目しており、TMZとの相乗効果を期待している。そこで、ヒト悪性神経膠腫（膠芽腫）細胞株を用いて基礎実験を行い、臨床上の治療戦略となりうる結果・示唆を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：神経膠腫、テモダール、インターフェロン、アルキル化薬、MGMT、メチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) 星細胞系悪性神経膠腫に対しては、集学的治療が行われてもほとんどが再発し、最終的には腫瘍死を免れない。最も悪性である膠芽腫 (glioblastoma, WHO grade IV) では通常6～12カ月で、また grade III の退形成性星細胞腫 (anaplastic astrocytoma) では18～36カ月で再発するとされている。脳腫瘍全国集計調査報告にも示されているように、星細胞系悪性腫瘍なかでも膠芽腫の5年生存率は過去30年間に向上したとは言い難く、現在でも7.2%と悲惨な状況である。きわめ

て難治性の腫瘍であり、治療成績の改善は大きな課題である。

(2) 悪性神経膠腫に対する化学療法の歴史を振り返ると、1993年Fineらにより、16のrandomized controlled trial (RCT) におけるmeta-analysisが報告され、(放射線治療群と比較して) 化学療法併用群で生存率が有意に優れていることがはじめて示された。その後、2002年British Medical Research Councilより、12のRCT (計3004例) についてのmeta-analysisから、nitrosourea系薬剤の併用使用がわずかではあるが悪性神経

膠腫の生存期間を延長させることが再確認された。そして2005年に、Stuppらが初発の膠芽腫において、放射線治療単独群とtemozolomide (TMZ) 併用群の比較でTMZの有用性を示した。この報告(phase III study)は、TMZを非常に注目させるものであり、悪性神経膠腫における化学療法がnitrosourea系薬剤からTMZに移行させるものであった。しかしながら、生存期間の中央値(median OS)が、12.1ヶ月から14.6ヶ月へ延長した2.5ヶ月の上乗せ効果に過ぎず、**TMZのみで膠芽腫の治療が十分であるという状況には至っていない。**

(3) 一方、nitrosourea系薬剤やTMZが属するアルキル化薬の耐性機序を考える上で、*O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)が重要な因子と考えられてきた。上述したTMZの有用性を示したphase III studyの付随研究でHegiらは、MGMTプロモーター領域のメチル化がある場合にTMZの有意な効果があると報告している。MGMT高発現の腫瘍では(nitrosourea系薬剤や)TMZへの感受性が低いことが予想され、MGMT活性を抑制(枯渇)することで感受性化をはかる耐性克服法も期待されている。

しかしながら、*O*⁶-benzylguanine (*O*⁶-BG)やprocarbazine (PCZ)などを中心に耐性の克服が検討されているが、**有意な臨床効果を得たとのevidence levelの高い報告はない。**

(4) 我々はかねてより、interferon-beta (IFN-β)に注目してきた。星細胞腫(astrocytoma, WHO grade II)においては手術摘出度とIFN-β療法(軽微な副作用にて高い奏効率)が有意な予後因子であること、悪性神経膠腫においてはIAR(IFN-β+ACNU+放射線療法)が有効であることなどを報告してきた。そんななか、Natsumeらにより*in vitro*におけるIFN-βによるTMZの増強効果が報告されている。また、RT0G9710の報告では、IFN-βとTMZとの併用療法の有効性が示唆されている。

2. 研究の目的

悪性星細胞系腫瘍はきわめて難治性であり治療成績の改善は大きな課題である。そんな中、temozolomide (TMZ)が認可され、大きな役割を持つものと注目されている。しかし、TMZは延命効果を示すものの、満足すべき治療効果を約束するものではない。特にメチル化修復酵素であるMGMTの関与が示唆される薬剤抵抗性や、その克服を考えたTMZ+αが大きな課題でもある。

本研究は、悪性神経膠腫細胞を用いた基礎研究を通して、悪性神経膠腫の治療成績の向上に結び付けようとするものである。特に、TMZ+αの治療を模索し、悪性神経膠腫におけ

る新たな治療戦略を確立しようとするものである(個々の症例に応じて抗癌剤を選択する個別化化学療法のシステム構築に寄与するものでもある)。

3. 研究の方法

7種類のヒト悪性神経膠腫細胞株(A-172、AM-38、T98G、U-87MG、U-138MG、U-251MG、YH-13)を用いて以下の実験を行った。

(1) 細胞株における薬剤感受性(抗腫瘍効果)の検討

① TMZとIFN-βの細胞増殖抑制効果

② 細胞死誘導作用

など。

詳細は、下記の主な発表論文におけるYoshino A., et al: Effect of IFN-β on human glioma cell lines with temozolomide resistance. Int J Oncol. 2009を参照。

(2) 細胞株における薬剤耐性の検討: TMZとMGMTとの関係

薬剤耐性の機序は、1)細胞内解毒機構の亢進、2)抗癌剤の排出機構の亢進、3)DNA修復機構の亢進が挙げられる。これらの耐性機序の中で、相関が示されているのは、DNA修復機構のMGMT(メチル化修復酵素)のみである。腫瘍細胞内レベルが独立した予後因子であると報告されている(Jaeckle KA et al. 1998)。

そこで、MGMTを中心として、

① Methylation-specific PCR (MSP) of MGMT promoter (Estellerらの方法による)

② Western blot analysis of MGMT expression at the protein level

③ Direct promoter sequencing that profiled the methylation status of 27 CpG site within the MGMT promoter (Mikeskaらの方法による。また判定はGrasbon-Frodlらの方法を参考とした)

④ Quantitation of MGMT mRNA by real-time quantitative RT-PCR (Tanakaらの方法による)

などを検討。

詳細は、下記の主な発表論文におけるYoshino A., et al: Effect of IFN-β on human glioma cell lines with temozolomide resistance. Int J Oncol. 2009 (in press)

Yachi K., et al: Relevance of MGMT assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastoma. Int J Oncol. 33: 469-475, 2008を参照。

(3) TMZとIFN-βの相乗効果

次にTMZとIFN-βの相乗効果を観察するために、培養液にIFN-β(0-1000 IU/ml)のみを

投与したものと、IFN-β (0-1000 IU/ml) に TMZ 10 μM を加えたものの細胞増殖抑制効果を観察した (72 時間後)。

Osterman らは、悪性神経膠腫患者における通常の TMZ 投与において、TMZ の血中濃度が 0.1-13.99 μg/ml であり髄液中濃度が 0.16-1.93 μg/ml であったと報告している。1.93 μg/ml はほぼ TMZ 10 μM に一致するために、IFN-β との併用療法における観察にこの濃度 (10 μM) を選んだ。

詳細は、下記の主な発表論文における Yoshino A., et al: Effect of IFN-β on human glioma cell lines with temozolomide resistance. Int J Oncol. 2009 を参照。

(4) T98G における TMZ と IFN-β の相乗効果

TMZ に対して抵抗性 (耐性) であり、MGMT (mRNA と蛋白レベル) を発現している T98G において以下の実験を行った (上記 (1) (2) の結果より)。

① IFN-β、TMZ、IFN-β と TMZ の細胞増殖抑制効果

TMZ の投与濃度は上記のごとく 10 μM とした。一方、IFN-β は 1 x 10⁶ または 3 x 10⁶ IU の点滴終了直後 (1 時間) の血中濃度が、40-96 IU/ml であったとの報告がある。そこで、IFN-β の投与濃度は 10 IU/ml とした。

② Quantitation of MGMT mRNA by real-time quantitative RT-PCR

詳細は、下記の主な発表論文における Yoshino A., et al: Effect of IFN-β on human glioma cell lines with temozolomide resistance. Int J Oncol. 2009 を参照。

(5) T98G における TMZ による内因性 IFN-β の誘導

TMZ 投与後 (無投与の control も含む)、24、48、72 時間の培地における IFN-β の濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて測定した。

IFN はいろいろな刺激によって、多くの細胞 (臓器) から産生される。そして、低分子量のものが刺激物となることが知られているとともに、脳腫瘍 (細胞) では IFN を産生されていることが証明されている。一方、IFN の遺伝子治療の研究から、内因性 (endogenous) IFN-β は外因性 (exogenous) IFN-β より (悪性神経膠腫に対する) 抗腫瘍効果が強いことが示されている。

そこで、低分子量である TMZ が、悪性脳腫瘍細胞から内因性 IFN-β の産生をもたらすか検討を行なった。

内因性 IFN は数々の研究から、1) 抗原とならないこと、2) 調節機構が働き必要以上には分泌されないこと、3) 1 回の刺激が比較的長い治療効果のある分泌をもたらすこと、4) 外因性 IFN の併用を拒むものではないこ

となどが注目されている。また、経口摂取可能である内因性 IFN 刺激物は、臨床において長期間の投与に適しており、TMZ は経口の抗腫瘍薬でもあるのでさらに注目される。

(6) TMZ の抗腫瘍効果に関与が示唆される遺伝子の検索

① TMZ に対する感受性: TMZ に対する 7 種類のヒト悪性神経膠腫細胞株の IC₅₀ (50%-inhibition concentration)

② 遺伝子発現: 各細胞における遺伝子の発現状況: GeneChip (HumanGenome U133A 2.0 Array; Affymetrix) を用いて網羅的に検索 (HumanGenome U133A 2.0 Array は一度に 14500 個の遺伝子の発現量が検索可能)

① と ② を統計的に解析し、相関関係の強い遺伝子を抽出。Entrez Gene: gene-centered information at NCBI などのデータベースを利用して発現遺伝子を解析。

悪性神経膠腫における、TMZ の耐性機序やあらたな治療戦略を検討。

4. 研究成果

(1) 細胞株における薬剤感受性 (抗腫瘍効果) の検討

① TMZ と IFN-β の細胞増殖抑制効果

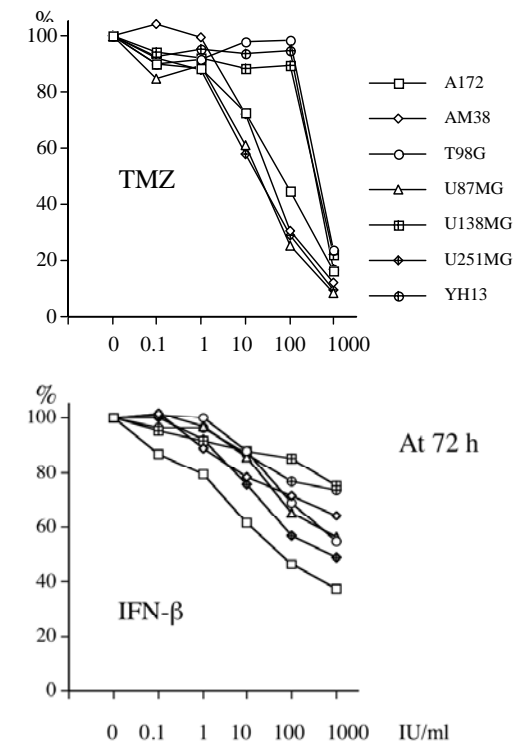
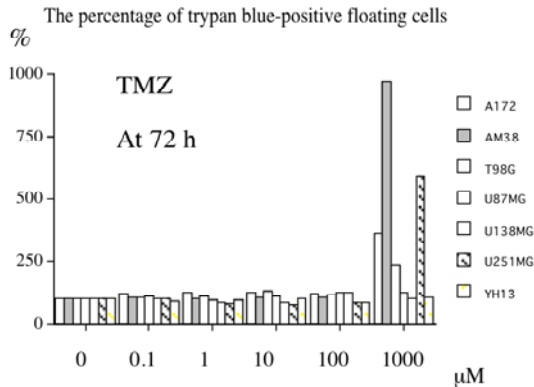


Fig. に示すごとく、7 種類のヒト悪性神経膠腫細胞に対する IFN-β の抗腫瘍効果は dose-dependent に認められた。一方、TMZ の抗腫瘍効果において、A-172、AM-38、U-87MG と U-251MG では IC₅₀ (50%-inhibition concentration) が 100 μM 以下であるのに対し

て、T98G、U-138MGとYH-13ではIC₅₀が100μM以上であった。T98G、U-138MGとYH-13細胞がTMZに対して抵抗性(耐性)であると考えられた。

② 細胞死誘導作用



TMZによる細胞増殖抑制作用は、細胞死誘導作用とは必ずしも一致しない。TMZは細胞死を誘導するというよりは、細胞周期・増殖抑制に働いていると考えられた。

また、IFN-βも同様に細胞死を誘導するというよりは、細胞周期・増殖抑制に働いていると考えられた。

(2) 細胞株における薬剤耐性の検討: TMZとMGMTとの関係

① Methylation-specific PCR (MSP) of MGMT promoter

S PC NC

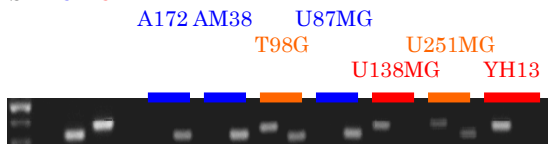


Fig.に示すように、A-172、AM-38とU-87MGはMGMTプロモーター領域のメチル化が有り、U-138MGとYH-13はメチル化が無く、T98GとU-251MGは部分的メチル化と判定した。

② Western blot analysis of MGMT expression at the protein level

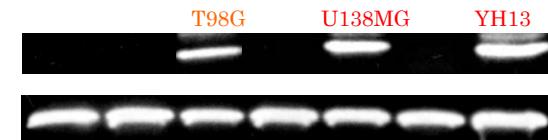


Fig.に示すように、A-172、AM-38、U-87MGとU-251MGではMGMT(蛋白レベル)の発現を認めなかったが、T98G、U-138MGとYH-13ではMGMTの発現を認めた。

③ Direct promoter sequencing that profiled the methylation status of 27 CpG site within the MGMT promoter

MGMTプロモーター領域のうち、A-172は78%、AM-38は82%、T98Gは100%、U-87MGは100%、U-138MGは0%、U-251MGは67%においてメチル化していた。また、50%以上をメチル化(陽性)と判定すると、MSPの結果と一致するものと考えられた。

MSPの正確性に疑問があるとの報告があるが、今回の検討ではMSPとdirect sequenceによる結果は一致していた。

なお詳細は、下記の主な発表論文における Yachi K., et al: Relevance of MGMT assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastoma. Int J Oncol. 33: 469-475, 2008 を参照。

④ Quantitation of MGMT mRNA by real-time quantitative RT-PCR

MGMT mRNAは、T98G、U-138MGとYH-13において、それぞれ5.9、6.3、5.4 x 10³ copy/μg RNAと測定できたが、A-172、AM-38、U-87MGとU-251MGでは測定できていない。これらはWestern blot analysisの結果と一致するものと考えられた。

以上より、(1)(2)をまとめると、

cell line	MSP	MGMT mRNA	Western blots
A-172	M	N.D.	N.D.
AM-38	M	N.D.	N.D.
T98G	M&U	5.9 x 10 ³	Expression
U-87MG	M	N.D.	N.D.
U-138MG	U	6.3 x 10 ³	Expression
U-251MG	M&U	N.D.	N.D.

MSP: methylation-specific PCR

M: methylation, U: unmethylated

N.D.: not detected

MGMT mRNA: copy/μg RNA

TMZの感受性には、MGMTが強く関与していることが確認された。

(3) TMZとIFN-βの相乗効果

Cell growth inhibitory effect of a combination of TMZ and IFN-β

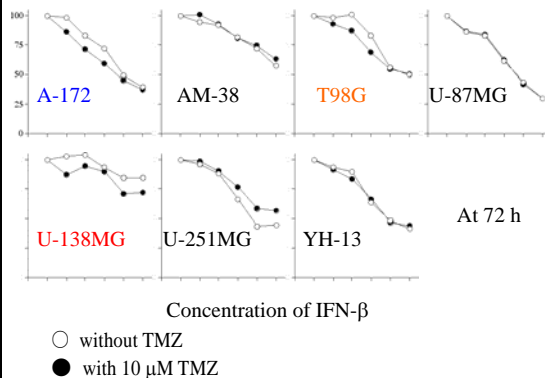


Fig.に示すごとく、A-172、T98GとU-138MGの3種類の細胞において相乗効果(細胞増殖抑制;抗腫瘍効果)が認められた。T98GとU-138MGはMGMT(mRNAと蛋白レベル)

が発現しており、TMZ に対して抵抗性（耐性）であった細胞である。

TMZ と IFN-β の投与濃度について：
 上述のように、TMZ は 10 μM、IFN-β は 10 IU/ml が臨床と合致する濃度と考えている。

以下、(4) (5) (6) に対しては、TMZ に対して抵抗性（耐性）であり、MGMT を発現している T98G 細胞株を中心に検討を行なった。

(4) T98G における TMZ と IFN-β の相乗効果

① IFN-β、TMZ、IFN-β と TMZ の細胞増殖抑制効果

IFN-β、10 IU/ml；TMZ、10 μM とともに臨床と合致する薬剤濃度を使用。

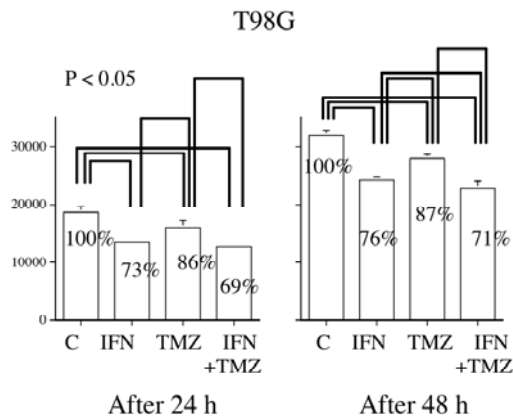


Fig. に control、IFN-β、TMZ、IFN-β と TMZ を投与した時の T98G (TMZ 抵抗性 (耐性) 細胞) における細胞増殖抑制効果を示す。

IFN-β と TMZ の併用によって有意に相乗した細胞増殖抑制 (抗腫瘍) 効果が認められた。

② Quantitation of MGMT mRNA by real-time quantitative RT-PCR

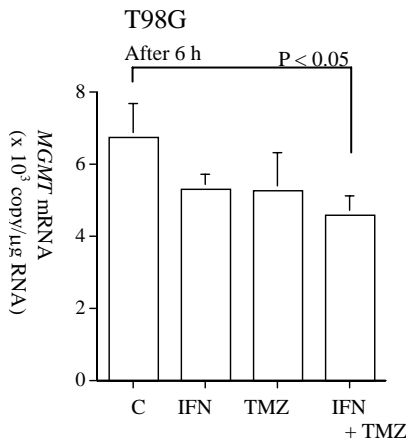


Fig. に control、IFN-β、TMZ、IFN-β と TMZ を投与した 6 時間後の T98G における MGMT mRNA を示しているが、有意に IFN-β と TMZ の併用投与における相乗した MGMT mRNA の抑制効果が認められた。

(3) (4) をまとめると、

TMZ に対して耐性である T98G 細胞において、TMZ と IFN-β の併用は synergetic な (細胞増殖) 抑制効果が認められた。臨床での併用療法に期待がもたれる。

特に、臨床における薬剤濃度において (10 μM TMZ、10 IU/ml IFN-β)、単剤では認められなかった有意な MGMT mRNA の発現の減少が認められた (realtime PCR を用いた mRNA の定量)。なお、U-138MG においても同様の結果を得ている (preliminary data)。

(5) T98G における TMZ による内因性 IFN-β の誘導

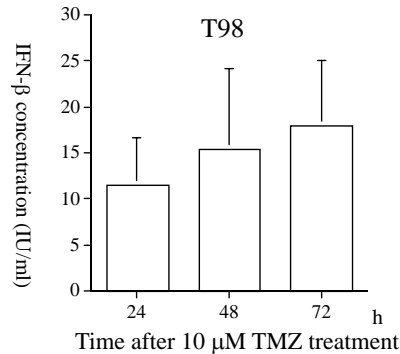
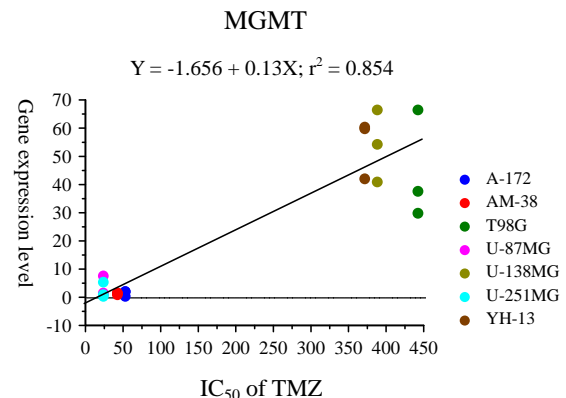


Fig. に示すごとく、T98G 細胞 (ヒト悪性神経膠腫細胞) において、TMZ (10 μM：臨床における薬剤濃度) により内因性 IFN-β が産生されることが確認された。また、長時間産生 (分泌) されるとともに、十分な量 (10 IU/ml 以上) が産生されることが確認された。

なお、他の細胞株においても同様の結果を得ている (preliminary data)。

TMZ が内因性 IFN-β を産生させることを初めて確認したものである。そして、TMZ の新たな抗腫瘍効果を確認したものである。

(6) TMZ の抗腫瘍効果に関与が示唆される遺伝子の検索



TMZ に対する感受性 (TMZ に対する IC₅₀) と遺伝子発現 (GeneChip を用いて網羅的に検索) において相関関係が強いものを抽出。Fig. は抽出できた MGMT 遺伝子の相関関係を示したものである。高い相関係数を示している。

TMZ の感受性には MGMT が強く関与することが、再確認された。

現在、相関関係が強い遺伝子の抽出は終了しており、Entrez Gene: gene-centered information at NCBI などのデータベースを利用して、遺伝子を解析中である。悪性神経膠腫における、TMZ の耐性機序やあらたな治療戦略を提示できるものと考えている。

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3件)

- ① Yoshino A., Ogino A., Yachi K., Ohta T., Fukushima T., Watanabe T., Katayama Y., Okamoto Y., Naruse N., Sano E.: Effect of IFN- β on human glioma cell lines with temozolomide resistance. Int J Oncol. 2009 (in press)、査読有
- ② 吉野篤緒、谷地一成、太田 隆、荻野暁義、福島崇夫、渡邊学郎、片山容一：悪性神経膠腫に対するTMZとIFN- β の相乗効果に関する基礎研究. Neuro-Oncology (Tokyo)、19巻、2009 (in press)、査読無
- ③ Yachi K., Watanabe T., Ohta T., Fukushima T., Yoshino A., Ogino A., Katayama Y., Nagase H.: Relevance of MGMT assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastoma. Int J Oncol. 33: 469-475, 2008、査読有

[学会発表] (計12件)

- ① Yoshino A., Ogino A., Yachi K., Ohta T., Fukushima T., Watanabe T., Katayama Y., Okamoto Y., Naruse N., Sano E.: Synergistic effect of human IFN-beta and TMZ on malignant glioma cell lines. The 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology jointly with The 6th Meeting of the ASNO. 2009. 5.14, Yokohama, Japan
- ② Yachi K., Ohta T., Ogino A., Fukushima T., Watanabe T., Yoshino A., Katayama Y.: Relevance of MSP assay for the detection of MGMT promoter Hypermethylation in glioblastoma. The 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology jointly with The 6th Meeting of the ASNO. 2009. 5.14, Yokohama, Japan
- ③ 渡邊学郎、谷地一成、太田 隆、福島崇夫、吉野篤緒、片山容一、永瀬浩喜、

GlioblastomaにおけるMGMT遺伝子のメチル化解析の意義、第26回日本脳腫瘍学会、2008. 11. 30、愛媛

- ④ 吉野篤緒、荻野暁義、太田 隆、福島崇夫、渡邊学郎、片山容一、佐野恵海子、成瀬紀男：悪性神経膠腫に対するIFN- β とテモゾロミドによる相乗効果、社団法人日本脳神経外科学会第67回学術総会、2008. 10. 1、盛岡
- ⑤ 谷地一成、太田 隆、荻野暁義、福島崇夫、渡邊学郎、吉野篤緒、片山容一：GlioblastomaにおけるMGMT遺伝子メチル化の意義：個別化化学療法におけるMSPの信憑性の検証、社団法人日本脳神経外科学会第67回学術総会、2008. 10. 1、盛岡
- ⑥ Yachi K., Ohta T., Ogino A., Fukushima T., Watanabe T., Yoshino A., Katayama Y.: Relevance of MSP assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastomas. Eight Congress of the European Association for Neuro-Oncology (EANO). 2008. 9. 12, Barcelona, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 篤緒 (YOSHINO ATSUO)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号：50256848

(2) 研究分担者

片山 容一 (KATAYAMA YOICHI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：00125048
渡邊 学郎 (WATANABE TAKAO)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号：40287652
福島 崇夫 (FUKUSHIMA TAKAO)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：20350019

(3) 連携研究者

なし