

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 2 月 10 日現在

機関番号：32409
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20591719
 研究課題名(和文) 血中分子マーカー定量による悪性グリオーマの抗腫瘍剤感受性のモニタリング
 研究課題名(英文) Evaluation of chemosensitivity in malignant gliomas : quantitative assessment of serum molecular marker.
 研究代表者
 安達 淳一 (ADACHI JUNICHI)
 埼玉医科大学・医学部・講師
 研究者番号：70291143

研究成果の概要(和文): アルキル化剤であるテモゾロミド投与の効果が期待できる重要なファクターである MGMT (*O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) 遺伝子プロモーターのメチル化の程度を定量的に評価できる方法を確立した。その結果、グリオーマ組織において 40% 以下のメチル化を示す症例では有意に短い無増悪生存期間を呈することがわかった。また、小児グリオーマの MGMT 遺伝子メチル化の割合は成人グリオーマより明らかに低値であり、このことが小児グリオーマに対するテモゾロミド感受性が低い理由の 1 つである可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文): Establishment of quantitative assessment of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation, which is prognostic and chemosensitive molecular marker in high-grade gliomas. Gliomas with MGMT methylation less than 40% showed significantly short progression-free survival. The frequency of MGMT promoter methylation in newly diagnosed pediatric glioma, regardless tumor grades, was lower than the proportion seen in adult glioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

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：グリオーマ、脳腫瘍、MGMT

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に発生する悪性腫瘍の大半は退形成性星細胞腫(Anaplastic astrocytoma)あるいは神経膠芽腫(Glioblastoma)とい

ったハイグレードな浸潤性グリオーマである。治療に関しては、その“浸潤性”という性格上、手術にてこれらの腫瘍を根治させるには限界があり、現在の治療の標準は手術に

て腫瘍を摘出した後、残存腫瘍に放射線治療と化学療法を加えることである。化学療法については、ACNU などの nitrosourea 剤が 20 年以上に渡り悪性グリオーマ治療の中心の薬剤であったが、2006 年 9 月に新たにアルキル化剤のテモゾロミドが本邦で使用が認可された。この薬剤は EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) で行われた初発膠芽腫に対する、放射線照射単独群とテモゾロミド併用照射群との比較で、後者が従来示された以上の有意差で生存期間の延長が認められた抗腫瘍剤である。経口投与が可能で利便性に優れていることから、現在、テモゾロミドが悪性グリオーマの化学療法の主軸になっている。さて、テモゾロミドが悪性グリオーマ患者における放射線治療への有意な上乘せ効果が示されているわけであるが、腫瘍細胞の MGMT (*O*-methylguanine-DNA-methyltransferase) 遺伝子のプロモーターにメチル化が見られ、MGMT 発現が低下している群で特にこの抗腫瘍効果を期待できることがわかっている。MGMT は nitrosourea 剤やテモゾロミドなどのアルキル化剤により付加されるアルキル基を除去する作用を持ち、腫瘍細胞のアルキル化剤への耐性に深く関与する細胞の DNA 修復酵素のひとつである。従って、個々の脳腫瘍の MGMT 遺伝子のメチル化の解析はテモゾロミドなどの抗腫瘍剤への薬剤感受性を予測する上で重要である。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究は腫瘍由来 DNA の MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化の定量的な解析を行い、これを脳腫瘍の抗腫瘍剤（特にテモゾロミド）への感受性をモニターする分子マーカーとして利用できる方法を確立するために企画した。

3. 研究の方法

手術で摘出した腫瘍から DNA をまず抽出し、bisulfite 処理し、飽和型インターカレート色素の存在下で目的の MGMT 遺伝子プロモーター領域を PCR で増幅した。その後、高解像度融解曲線の分析を行った。融解曲線の波形の解析で非メチル化とメチル化のバリエーションの比率が決定できるため、既知の非メチル化とメチル化テンプレートを混合したスタンダードの融解曲線データとの相似性から、未知サンプル DNA の MGMT メチル化レベルを評価できた。血清中の腫瘍由来の微量 DNA でも MGMT 遺伝子のメチル化の定量が可能であった。以上の方法で MGMT 遺伝子メチル化の定量的解析法を得ることができた (図 1)。

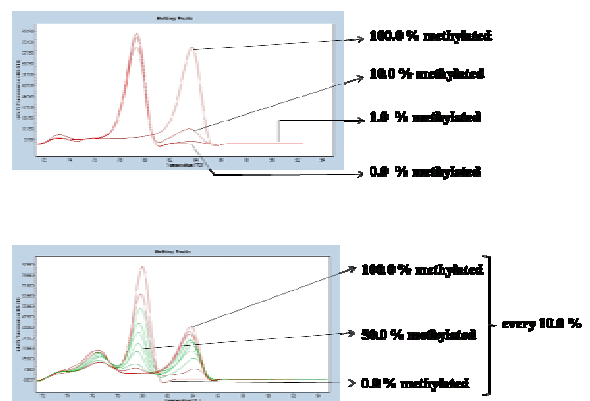


図1 Tm: melting temperature (融解温度)

4. 研究成果

(1) PCR 開始から融解曲線が得られるまでに要する時間は約 1 時間 30 分であった。飽和型色素を用いる本法は温度正確性、再現性が高く、かつ短時間で解析が完了する点で有用であった。また、血清中の腫瘍由来の微量 DNA でも MGMT 遺伝子のメチル化の定量が可能であった。以上により、本研究の根幹である遺伝子メチル化の定量的解析法を得ることができた。

(2) 成人及び小児悪性グリオーマにおける MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化の定量を行ったところ、腫瘍組織において 40% 以下のメチル化を示す症例では有意に短い無増悪生存期間を呈することがわかった。

(3) 小児グリオーマの MGMT 遺伝子メチル化の割合は成人グリオーマより明らかに低値であり、このことが小児グリオーマに対するテモゾロミド感受性が低い理由の 1 つである可能性が考えられた。一方、MGMT 遺伝子メチル化陽性グリオーマではテモゾロミドが奏功した例もみられた。テモゾロミドは注射剤も発売され、小児グリオーマでも確実な投与が期待でき、症例によってはテモゾロミド治療が選択枝の 1 つとなりうる可能性も考えられた。

(4) 脳悪性リンパ腫 45 例における MGMT 遺伝子メチル化陽性率は 51% であった。また、グリオーマに比して高メチル化を呈する症例が多かった (表 1)。そして、テモゾロミドに良く反応した腫瘍では MGMT メチル化陽性群が多かった。この結果は、現在予後不良である脳悪性リンパ腫に対する新たな化学療法薬としてテモゾロミドの有用性を示唆させるデータであった。

表 1

Methylation status of the MGMT promoter in 45 PCNSL patients

Degree of MGMT promoter methylation (%) ^a	No.
<4.0 (= unmethylated cases)	22
4.1-9.9	3
10.0-19.9	1
20.0-29.9	2
30.0-39.9	2
40.0-49.9	2
50.0-59.9	0
60.0-69.9	2
70.0-79.9	4
80.0-89.9	2
90.0-100.0	5

^aPercentage of methylated CpG sites in average.

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 10 件)

Adachi J, Mishima K, Wakiya K, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Matsutani M, Sasaki A, Nishikawa R.

O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in

45 primary central nervous system lymphomas: quantitative assessment of methylation and response to temozolomide treatment.

J Neurooncol 査読有. 107, 2012, 147-153

Liu KW, Feng H, Bachoo R, Kazlauskas A, Smith EM, Symes K, Hamilton RL, Nagane M, Nishikawa R, Hu B, Cheng SY.

SHP-2/PTPN11 mediates gliomagenesis driven by PDGFRA and INK4A/ARF aberrations in mice and humans.

J Clin Invest 査読有 121, 2011, 905-917

Adachi J, Totake K, Mishima K, Suzuki T, Wakiya K, Yanagisawa T, Matsutani M and Nishikawa R.

Methylation-sensitive high-resolution melting analysis: Quantitative assessment of MGMT promoter methylation in high-grade gliomas.

Neuro-Oncology 査読有 12, 2010, 31

Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Wakiya K, Adachi J, Mishima K, Matsutani M, Fujimaki T, Nishikawa R.

Metronomic chemotherapy with daily oral etoposide for recurrent refractory germ cell tumours.

Neuro-Oncology 査読有 12, 2010, 107

安達 淳一, 西川 亮, 松谷 雅生. 乏突起膠腫の診断と治療反応性の予測に有用な分子マーカーの探索. 埼玉医科大学雑誌 査読無 36 (1), 2009, 56-59

西川 亮. テモゾロミドによるグリオーマ治療. Brain and Nerve 査読無 61(7), 2009, 849-854

Wakabayashi T, Kayama T, Nishikawa R, Takahashi H, Yoshimine T, Hashimoto N, Aoki T, Kurisu K, Natsume A, Ogura M, Yoshida J.

A multicenter phase I trial of interferon-beta and temozolomide combination therapy for high-grade gliomas (INTEGRA Study).

Jpn J Clin Oncol. 査読有 38(10), 2008, 715-718

Hayatsu N, Kaneko MK, Mishima K, Nishikawa R, Matsutani M, Price JE, Kato Y.

Podocalyxin expression in malignant astrocytic tumors. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 19;374 (2), 2008, 394-398

Iwakawa R, Kohno T, Anami Y, Noguchi M, Suzuki K, Matsuno Y, Mishima K, Nishikawa R, Tashiro F, Yokota J. Association of p16 homozygous deletions with clinicopathological characteristics and EGFR/KRAS/p53 mutations in lung adenocarcinoma. J. Clin Cancer Res. 査読有 14(12), 2008, 3746-3753
Kato Y, Hayatsu N, Kaneko MK, Ogasawara S, Hamano T, Takahashi S, Nishikawa R, Matsutani M, Mishima K, Narimatsu H. Increased expression of highly sulfated keratan sulfate synthesized in malignant astrocytic tumors. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 16;369(4), 2008, 1041-1046

[学会発表](計31件)

Adachi J MGMT promoter methylation status in newly diagnosed pediatric gliomas. 16th annual scientific meeting of the society for neuro-oncology. 2011.11.9 Orange County, California, USA

Adachi J MGMT promoter methylation status in newly diagnosed pediatric gliomas. 8th meeting of Asian Society for Neuro-Oncology 2011.5.27 Suzhou, China

Nishikawa R Treatment of central nervous system lymphomas with temozolomide-preliminary results with MGMT promoter methylation status. 8th meeting of Asian Society for Neuro-Oncology 2011.5.27 Suzhou, China

Adachi J Methylation-sensitive high resolution melting analysis: Quantitative assessment of MGMT promoter methylation in high-grade gliomas. 9th Meeting of The European Association of NeuroOncology 2010.9.17 Maastricht, Netherlands

Adachi J Methylation-sensitive high resolution melting analysis: a new quantitative assessment of MGMT promoter methylation in gliomas. The 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology 2009.5.14 Yokohama, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 淳一 (ADACHI JUNICHI)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70291143

(2) 研究分担者

西川 亮 (NISHIKAWA RYO)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90237678

松谷 雅生 (MATSUTANI MASAO)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90010454
(H20、H21のみ)