

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16390

研究課題名（和文）ミスマッチ修復欠損神経膠腫細胞に対するTMZ抵抗性を克服する新治療の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapeutic strategy to overcome TMZ resistance to Mismatch repair deficient glioma cells by PARP inhibitors

研究代表者

樋口 芙未（HIGUCHI, Fumi）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：20537104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：悪性神経膠腫におけるミスマッチ修復（MMR）欠損は、標準治療薬テモゾロミド（TMZ）に対する抵抗性の原因となる。本研究では、MMR欠損神経膠腫細胞株に対して、PARP（ポリADP-リボースポリメラーゼ）阻害剤の併用により、TMZに対する感受性が回復することを見出した。そのメカニズムの解明のためDNA損傷反応や、各種DNA修復機構に関連するpathwayに注目し、遺伝子発現解析を行ったが、治療による発現変化は認められず関与を証明できなかった。一方で、治療細胞では、細胞老化現象が誘導されており、TMZ、PARP阻害剤の併用治療の機序として細胞老化の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、再発悪性神経膠腫に対して確実な延命効果を示す治療方法は確立されていない。標準治療薬である、TMZに対する抵抗性は腫瘍の再発と密接に関連しており、本研究で示された、PARP阻害剤の併用による感受性の回復は、再発悪性神経膠腫のあらたな治療戦略となる可能性がある。また今後、感受性回復のメカニズムの解明をさらにすすめることで、TMZ抵抗性の獲得を回避する併用治療や、より効果の高い併用治療薬を探索する研究へと発展できる。本研究の成果は、悪性神経膠腫に対する新しい治療戦略を生み出す研究への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Mismatch repair (MMR) deficiency in malignant gliomas causes resistance to temozolomide (TMZ) which is the standard chemotherapeutic agent. we found that the combination therapy of PARP (poly ADP-ribose polymerase) inhibitors restored the TMZ sensitivity to MMR-deficient glioma cells. To elucidate the mechanism for the combination treatment, we performed gene expression analysis focusing on the DNA damage response and pathways but no remarkable gene expression changes were observed. On the other hand, cellular senescence was induced in the treated cells, suggesting the cellular senescence as a mechanism of the combination treatment TMZ with PARP inhibitors.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経膠腫 Temozolimide Mismatch repair

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は、いまだ完治が困難な疾患であり、摘出術に加えて放射線・化学療法を併用した集学的治療が標準治療である。テモゾロマイド(TMZ)は唯一、有効性の認められた化学療法剤であり、神経膠腫治療における化学療法の中心を担っているがその治療効果は不十分でありほぼほとんどの症例で再発を免れない。再発悪性神経膠腫の20-30%に mismatch repair (MMR) 遺伝子なかでも MSH6 遺伝子の特徴的な変異が認められ、この変異が Temozolomide(TMZ)に対する抵抗性の要因となっている。したがって、MMR 欠損による TMZ に対する抵抗性の克服は、悪性神経膠腫治療において重要な課題である。

PARP (ポリ ADP-リボースポリメラーゼ) は DNA 損傷反応に必須の分子であり、BER (塩基除去修復)、HR (相同組み換え)、NHEJ (非同相末端結合) など多くの DNA 修復機構に参与している。PARP 阻害剤は、単剤での抗腫瘍効果に加えて、他の化学療法剤との併用において、様々な腫瘍細胞に対しての抗腫瘍効果が認められ、TMZ との併用についても、いくつかの腫瘍細胞で効果促進作用が報告されている。また一部悪性神経膠腫細胞株において、PARP 阻害剤と TMZ の併用効果が報告されているが、その効果は限定的で、効果が期待できるサブグループを同定することが今後の課題と考えられる。我々のこれまで研究において、MMR 欠損神経膠腫細胞株の一つにおいて、PARP 阻害剤の併用治療によって TMZ に対する感受性が回復する結果を得た。これらのことから、MMR 欠損による TMZ 抵抗性に focus して PARP 阻害剤併用の効果を評価することは、TMZ 抵抗性を回避するあらたな治療戦略や再発悪性神経膠腫に対する新しい治療戦略の開発につながる事が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、MMR 欠損 TMZ 抵抗性神経膠腫細胞において、PARP 阻害剤の併用により TMZ の抵抗性が克服できるどうか評価することを目的とする。また併用効果のメカニズムの探求として、MMR 欠損による DNA 損傷反応、DNA 修復機構への変化、TMZ 投与に対するこれらの変化を研究し、併用治療効果のメカニズムを解明する。これらの研究を通して、現在治療方法のない、再発悪性神経膠腫のあらたな治療戦略を開発することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 神経膠腫細胞株を使用した、TMZ、PARP 阻害剤の併用効果の評価

複数の MSH6KD 神経膠腫細胞株、患者腫瘍由来 neurosphere MSH6KD 細胞株に対して TMZ 単剤、PARP 阻害剤単剤、TMZ・PARP 阻害剤併用での治療を行い、細胞増殖抑制効果を評価する。コントロールベクター導入細胞との結果を比較するほか、患者腫瘍由来 MSH6 欠損細胞株を使用して同様の実験を行い、併用治療の効果を評価する。また、正常星細胞を使用した実験を行い、正常細胞に対する併用治療の毒性を調べる。

(2) TMZ・PARP 阻害剤の併用治療効果の機序の評価

PARP 阻害剤による TMZ 感受性回復効果の詳細を解明するため、抵抗性解除効果が認められた細胞株を使用して、各 TMZ、PARP 阻害剤単剤治療、TMZ・PARP 阻害剤併用治療に対する DNA 損傷反応・Cell cycle の変化を調べる。

(3) TMZ・PARP 阻害剤の併用治療効果の In vivo での効果判定

TMZ + PARP 阻害剤併用治療の In vivo での効果を評価するため、感受性回復が認められた細胞株を使用して、マウスを使用した動物実験を行う。まず皮下腫瘍モデルにて、腫瘍増大抑制効果を

評価する。また脳血液関門による薬剤濃度の低下が想定されることから、つぎに脳腫瘍モデルを使用して、同様の実験を行う。

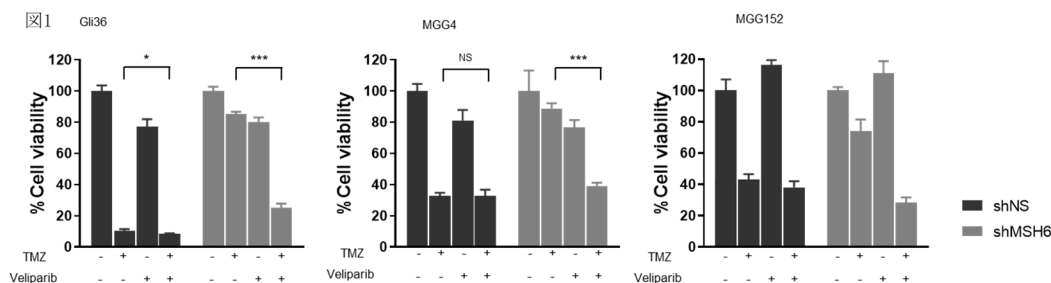
(4) PARP 阻害剤の TMZ 感受性回復メカニズムの解明

DNA 修復機構、DNA 損傷反応に関連する遺伝子の発現変化を解析し、PARP 阻害剤の効果のキーとなる遺伝子、シグナル伝達を同定する。また Microarray、RNA sequencing などを用いて網羅的な発現解析を行い、感受性回復に寄与する想定外のシグナル伝達、遺伝子発現を調べる。

4 . 研究成果

(1) 神経膠腫細胞株を使用した、TMZ、PARP 阻害剤の併用効果の評価

複数の MSH6KD 神経膠腫細胞株、患者腫瘍由来 neurosphere MSH6KD 細胞株において、PARP 阻害剤の併用治療で、TMZ に対する感受性が回復した。(図 1) 複数の PARP 阻害剤で同様の効果が認められた。(Veliparib, Olaparib) また患者由来の MMR 欠損神経膠腫細胞株でも PARP 阻害剤併用による感受性効果が認められた一方で、正常星細胞では併用治療の毒性はほとんどなかった。



(2) TMZ・PARP 阻害剤の併用治療効果の機序の評価

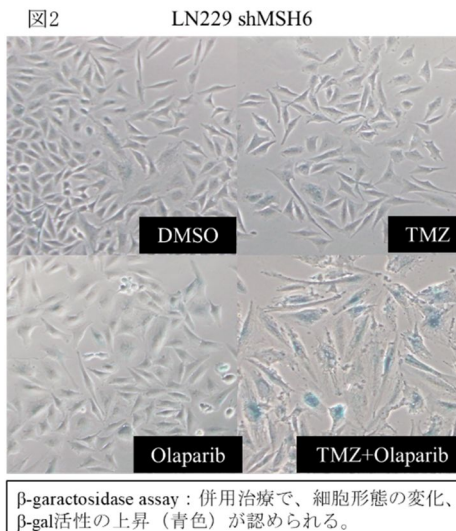
併用治療時の DNA 損傷反応、Cell cycle の変化、Apoptosis の評価を行ったところ、併用治療時には細胞周囲の停止が認められるものの DNA 損傷反応や、Apoptosis に陥る細胞は少なく、治療効果の主体は、細胞増殖抑制効果と考えられた。

(3) TMZ・PARP 阻害剤の併用治療効果の In vivo での効果判定

LN 2 2 9 細胞株を使用して、マウスによる皮下腫瘍モデル、脳腫瘍モデルで併用治療効果の実験を行った。皮下腫瘍モデルでは、併用治療にて、腫瘍増大抑制効果は単剤と比較して有意に高く、脳腫瘍モデルでは、併用治療において TMZ 単剤治療では認められなかった生存期間の延長効果が認められた。

(4) PARP 阻害剤の TMZ 感受性回復メカニズムの解明

PARP 阻害薬が重要な役割を果たす BER に注目し、発現解析、シグナル伝達にかかわる遺伝子発現抑制による機序の解明を行ったが、BER の関与は否定的であった。網羅的な Microarray を行ったところ、細胞老化に関する遺伝子発現に変化が認められた。併用治療効果の認められた細胞株において、細胞老化に特徴的な細胞の形態変化や細胞老化マーカーが誘導されており(図 2) 併用治療による細胞増殖抑制効果の機序として、細胞老化の関与が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Higuchi Fumi, Uzuka Takeo, Matsuda Hadzki, Sumi Takuma, Iwata Kayoko, Namatame Takashi, Shin Masahiro, Akutsu Hiroyoshi, Ueki Keisuke	4. 巻 41
2. 論文標題 Rise of oligodendrogloma hypermutator phenotype from a subclone harboring TP53 mutation after TMZ treatment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 80 ~ 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10014-024-00477-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 樋口 芙未1, 2, 宇塚 岳夫2, 角拓真2, 岩田佳代子2, 秋元 一三 阿久津博義2, 辛正廣
2. 発表標題 Temozolomideは細胞老化を誘導して膠芽腫細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第41回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大本 裕次郎、樋口 芙未、木倉 亮太、後藤 芳明、沼倉 里枝、庄島 正明、斎藤 光次、笹島 ゆう子、横尾 英明、辛 正廣
2. 発表標題 術前画像診断に苦慮したDiffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutantの一例～WHO第5版にどう対応するのか～
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumi Higuchi, Takeo Uzuka, Takuma Sumi, Hazuki Matsuda, Kayoko Iwata, Masahiro Shin, Keisuke Ueki, Hiroyoshi Akutsu
2. 発表標題 Highly infiltrating oligodendrogliomas show different morphology from typical oligodendrogliomas while maintaining good response to chemo-radiation therapy.
3. 学会等名 27th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 3. 樋口 芙未、宇塚 岳夫、角 拓真、松田 葉月、岩田 佳代子、植木 敬介、辛 正廣、阿久津 博義
2. 発表標題 浸潤性の高いOligodendrogliomaにおける病理所見の特徴と、治療反応性について
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋口 芙未、角 拓真、松田 葉月、宇塚 岳夫、植木 敬介
2. 発表標題 初発時にTP53変異を認め再発時にMSH6変異を伴いhypermutatorとなった退形成性乏突起膠腫の一例
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口 芙未、松田 葉月、宇塚 岳夫、植木 敬介
2. 発表標題 初回放射線治療後の再発Oligodendrogliomaに対する再放射線治療の有用性
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumi Higuchi, Hazuki Matsuda, Takeo Uzuka, Kim Phyo, Keisuke Ueki
2. 発表標題 Recurrent Oligodendrogliomas after first chemo-radiation therapy responded remarkably to second-radiation
3. 学会等名 26th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 4. 樋口 芙未、角 拓真、松田 葉月、宇塚 岳夫、辛 正廣、阿久津 博義、植木 敬介
2. 発表標題 再発Oligodendrogliomaに対する再放射線治療の有効性について
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口 芙未、松田 葉月、宇塚 岳夫、金 彪、植木 敬介
2. 発表標題 膠芽腫におけるmismatch repair遺伝子発現の免疫染色による評価について
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋口 芙未、角 拓真、松田 葉月、宇塚 岳夫、金 彪、植木 敬介
2. 発表標題 初発・再発神経膠腫における Mismatch Repair発現欠損の免疫組織染色による評価
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumi Higuchi, Hazuki Matsuda, Takeo Uzuka, Phyo Kim, Keisuke Ueki
2. 発表標題 Evaluation of Mismatch Repair Gene Expression by Immunohistochemistry May Detect Early Phase of MMR deficiency in Recurrent Gliomas
3. 学会等名 2020 SNO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------