

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390409

研究課題名（和文）新規抗腫瘍効果判定を目指した分子標的イメージング診断薬の開発と臨床応用

研究課題名（英文）Development of molecular imaging tracers for anticancer drug resistant proteins

研究代表者

若林 俊彦 (WAKABAYASHI TOSHIHIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50220835

研究成果の概要（和文）：

悪性脳腫瘍、特に膠芽腫が化学療法に不応である大きな原因のひとつは、化学療法剤に対する耐性機構であり、近年その解明に向けて精力的に研究が散見される。癌腫に広く使用されるアルキル化抗癌剤の抗腫瘍効果は DNA 中の O⁶-methylguanine (O⁶-meG) の形成によるところが大きい。O⁶-meG は O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) により修復されてしまう。近年、この MGMT が分子標的として注目されており、いかに MGMT の発現・誘導を抑制するかが治療上の鍵となっていて、本酵素活性を不活化する試みが世界中で検討されている。本研究では MGMT を非侵襲的にイメージングすることを目的とし、MGMT の基質として知られている O⁶-ベンジルグアニンの誘導体である 4 つの化合物を合成し、MGMT との親和性を測定し、そのうちのひとつがもっとも有望であることを見いだした。これを基に PET プローブを合成し、PET を用いた分子イメージング、*in vivo* での動態および薬剤の脳内分布を明らかにする予定である。

研究成果の概要（英文）：

The DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT, AGT) is a determinant of the resistance of tumor cells to alkylating anticancer agents that target the O⁶ position of guanine. MGMT promoter methylation in tumors is regarded as the most common predictor of the responsiveness of glioblastoma to alkylating agents. However, MGMT promoter methylation status has been investigated mainly by methylation-specific PCR (MSP), which is a qualitative and subjective assay. In addition, the actual enzymatic activities associated with the methylation status of MGMT have not been explored. In the present study, we aimed to create a novel non-invasive MGMT imaging rather than MSP. First, we performed bisulfite pyrosequencing, and its correlation with enzymatic activity was determined using a novel quantitative assay for studying the functional activity of MGMT. MGMT enzymatic activity was assessed using fluorometrically labeled oligonucleotide substrates containing MGMT-specific DNA lesions and capillary electrophoresis to detect and quantify these lesions. In comparison with existing traditional assays, this assay was equally sensitive but less time consuming and easier to perform. MGMT promoter methylation was assessed in 41 glioblastomas by bisulfite pyrosequencing, and 5 samples with different values were chosen for comparison with enzymatic assays. In comparative studies, MGMT promoter methylation values obtained by bisulfite pyrosequencing were inversely proportional to the measured enzymatic activity. The present results indicate that the quantification of MGMT methylation by bisulfite pyrosequencing represents its enzymatic activity and thus, its therapeutic responsiveness to alkylating agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳腫瘍学

キーワード：分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍、特に膠芽腫が化学療法に不応である大きな原因のひとつは、化学療法剤に対する耐性機構であり、近年その解明に向けて精力的に研究が散見される。癌腫に広く使用されるアルキル化抗癌剤の抗腫瘍効果はDNA中のO⁶-methylguanine (O⁶-meG)の形成によるところが大きい。O⁶-meGはO⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)により修復されてしまう。近年、このMGMTが分子標的として注目されており、いかにMGMTの発現・誘導を抑制するかが治療上の鍵となっていて、本酵素活性を不活化する試みが世界中で検討されている。

2. 研究の目的

本研究ではMGMTを非侵襲的にイメージングすることを目的とし、MGMTの基質として知られているO⁶-ベンジルグアニンの誘導体を基にPETプローブを合成し、PETを用いた分子イメージング、*in vivo*での動態および薬剤の脳内分布を明らかにすることを目的とした。

高速C-メチル化反応を用いたPETプローブ候補化合物の設計・合成

一般に、薬剤の98%は血液脳関門 (BBB) 透過性に欠けているといわれている。BBBを単純拡散により透過する化合物においては、BBB透過性と化合物の脂溶性とは相関関係にあり、脂溶性が高まるほどBBB透過性が高くなる傾向にあるが、BBBに発現しているP糖タンパクなどの排出輸送系の基質となれば、その化合物の脳内移行性は制限される。このように、脳をターゲットとする薬剤開発は困難を極めるが、これまでに、研究分担者の一人である鈴木らは、中枢型プロスタサイクリン受容体 (IP₂) の基質であり、顕著な神経保護活性を示す15*R*-TICの合成に成功し、さらに短寿命放射核¹¹Cで標識した15*R*-[¹¹C]TICメチルエステルのPETトレーサーを用いてサルおよびヒト脳内への移行性を明らかにするとともに、IP₂受容体の画像化に成功した実績をもつ (*Stroke*, 2006)。

本研究で目的とするMGMTイメージングは、PET法を用いたO⁶-ベンジルグアニン (誘導体) の脳内移行性の評価結果に基づき、BBB透過特性をもつ化合物の獲得により実現される。加えて、上記した中枢系薬剤のPET画像化の成功は、鈴木らによる「高速C-メチル化」という画期的な手法の実現が鍵となった (*Trends Anal. Chem.*, 2004)。本手法は、従来のPETトレーサー合成の化学的基盤を刷新するべく、パラジウム0価触媒を用いた炭素-炭素結合反応を基軸とした高効率的合成法である。これまでに、sp² (アリール) 炭素、sp² (ビニル) 炭素、sp (アルキン) 炭素、sp³ (アルキル) 炭素の四形式のC-メチル化法が開発され、本手法の適用により原理的にはほとんどすべての有機化合物への[¹¹C]放射核導入 (PETトレーサー化) が可能となった。さらに、標識部位は炭素-炭素結合であるため代謝的に安定であり、メチル基は最小の炭素置換基であり極性の変化も最小限に留めているため親リガンドの活性を大きく変えてしまうことがない。この世界最先端PETトレーサー技術を活用することにより、信頼性の高いPET研究が展開できる。

3. 研究の方法

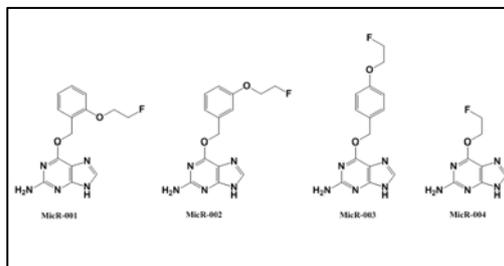
Biacoreテクノロジーを用いたMGMTとの分子間相互作用のKinetics解析とAffinity解析
テモゾロミド (TMZ) などのアルキル化抗癌剤の耐性機構には、DNA修復酵素であるO⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) が重要な鍵を握っている。MGMT分子は、アルキル化抗癌剤が形成するO⁶-methylguanine (O⁶-meG) を、脱メチル化しDNAを修復する。我々はMGMTを分子標的とした新規薬剤の開発、また、MGMTをバイオマーカーとするPET分子イメージング用新規プローブの開発に着手している。MGMTと結合する化合物とMGMT分子間の相互作用を解析することは、その反応の機能を明らかにする意味で極めて重要であり、その手段としてBiacoreテクノロジーを導入している。Biacoreとは標識を使わずにリアルタイムに

生体分子の相互作用をモニタリングするシステムである。リアルタイムに得られたデータは生体反応を制御するタンパクとその他の分子との相互作用を理解するのに必要な情報になる。これまでの我々の検討では、Biacore テクノロジーの特長は、ダイナミックレンジが広いこと、バッファー、アナライト、溶媒等の選択性が高く、疎水性の低分子化合物の測定に有効である点である。具体的には (1) センサー表面に固定された1種類の分子(リガンド)とさまざまな分子(アナライト)との結合レベルを観察することで相互作用の特異性を知ることができる。(2) 相互作用のカイネティクス、すなわち複合体形成の速さを表す速度定数は、結合速度定数(k_a)と解離速度定数(k_d)、センサーグラムの情報から算出できる。(3) 相互作用のアフィニティーを平衡時(センサーグラムの一定のシグナルとして確認)結合レベルとそのときのサンプル濃度のプロットから求めることができる。

1. リガンド、アナライトの決定: これまでの検討により、リガンドにMGMTを、アナライトに06-ベンジルグアニン誘導体を選択した。
2. リガンドの調整: リガンドをセンサーチップ表面に濃縮しながら効率良く固定化するために、プレコンセントレーション効果が確認できるpHの10mM酢酸ナトリウム緩衝液に、終濃度20 μ g/mlとなるように調整する。
3. Biacoreのセンサーチップへのリガンドの固定化: リガンドのMGMTがタンパクであり、活性部位にはチオール基が含まれているので、まずタンパクのアミノ基を利用したアミノカップリング法により固定化する。ここでMGMTの分子量が約25000、06-ベンジルグアニン誘導体が200程度であることよりセンサーの感度を高めるためMGMTの固定化する量を多めにみる必要がある。またセンサーチップにはMGMTを多く固定できるだろうCM5をまずは用いる。この方法でうまくいかなければアミノカップリングによりMGMTタンパクが変性してしまっていることが考えられるので他の固定化法を試みる。
4. アナライトの調整: ランニング緩衝液で希釈する。アナライトの濃度は親和性やリガンドとアナライトの分子量にもよるが、およそ数十ng/ml \sim で行う。
5. Biacoreによる相互作用測定: アナライトがリガンドへ流れ、センサーチップを介してアナライトとリガンドの結合・解

離が検出され、結合速度定数と解離速度定数が求められ解離定数(親和性)が算出される。

4. 研究成果



(1) 標準物質の生物学的力価測定結果

① U87MG、U87-wtMGMT-GFP 及び T98MG 細胞に対するテモダール細胞増殖阻害

U87MG 細胞にテモダール 10、100 及び 1000 \cdot M を 2 時間暴露した際の細胞増殖割合はそれぞれ、66.3、40.4 及び 22.8 %であった。U87-wtMGMT-GFP 細胞にテモダール 10、100、1000、3000 \cdot M を 2 時間暴露した際の細胞増殖割合はそれぞれ、116.3、109.5、99.1 及び 58.6 %であった。T98 細胞にテモダール 10、100 及び 1000 \cdot M を 2 時間暴露した際の細胞増殖割合はそれぞれ、87.2、92.1 及び 42.2 %であった。

② T98 細胞に対する BG 及び MicR-001 \sim 004 のテモダールの細胞増殖阻害増強結果

T98 細胞に BG 及び MicR-001 \sim 004 を 10 \cdot M、6 時間暴露した後、テモダール 1000 \cdot M を 2 時間暴露した際の細胞増殖率は 0.1 %DMSO 処理細胞は 5.99 であったのに対し、BG 及び MicR-001 \sim 004 処理細胞ではそれぞれ 4.99、5.07、4.74、4.58 及び 5.66 であった。また、BG 及び MicR-001 \sim 004 の暴露濃度を 90 \cdot M とした場合の細胞増殖率はそれぞれ、4.81、3.86、3.79、3.43 及び 4.81 であった。

(2) パイロット化合物による in vitro MGMT イメージング結果

T98 細胞に MicR-005 を 100 \cdot M にて 2、6、24 時間暴露した際の細胞の蛍光顕微鏡観察において、暴露 6 時間に細胞内に特異的な集積を確認した。また、MicR-005 を 24 時間暴露した T98 細胞は強い蛍光信号の集積を認めたが、同時に細胞形態の著しい変化が認められた。

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 13 件、全て査読あり)

1. Wakabayashi T, Kayama T, Nishikawa R, Takahashi H, Hoshimoto N, Takahashi

- J, Aoki T, Sugiyama K, Ogura M, Natsume A, Yoshida J. A multicenter phase I trial of combination therapy with interferon-beta and temozolomide for high-grade gliomas (INTEGRA study): the final report J Neurooncol 14-Feb Epub ahead of print 2011
2. Motomura K, Natsume A, Kishida Y, Higashi H, Kondo Y, Nakasu Y, Abe T, Namba H, Wakai K, Wakabayashi T. Benefits of interferon-beta and temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter: A multicenter study. Cancer 117(8) 1721-1730 2011
 3. Iwami K, Natsume A, Wakabayashi T Cytokine networks in glioma Neurosurg Rev 第 3 4 卷 253-264 2011
 4. Motomura K, Natsume A, Fujii M, Ito M, Momota H, Wakabayashi T Long-term survival in patients with newly diagnosed primary central nervous system lymphoma treated with dexamethasone, etoposide, ifosfamide and carboplatin chemotherapy and whole-brain radiation therapy. Leukemia and Lymphoma Epub ahead of print 2011
 5. Ohka F, Natsume A, Motomura K, Kishida Y, Kondo Y, Abe T, Nakasu Y, Namba H, Wakai K, Fukui T, Momota H, Iwami K, Kinjo S, Ito M, Fujii M, Wakabayashi T. The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. PLoS One 6(8) e23332 2011
 6. Motomura K, Natsume A, Wakabayashi T Intravenous administration of temozolomide as a useful alternative over oral treatment with temozolomide capsules in patients with gliomas. J Neurooncol 13-Jul Epub ahead of print 2011
 7. Natsume A, Kinjo S, Yuki K, Kato T, Ohno M, Motomura K, Iwami K, Wakabayashi T. Glioma-initiating cells and molecular pathology: Implications for therapy Brain. Tumor Pathol 28 1-28. 2011
 8. Momota H, Iwami K, Fujii M, Motomura K, Natsume A, Ogino J, Hasegawa T, Wakabayashi T. Rhabdoid glioblastoma in a child: case report and literature review. Brain Tumor Pathol 28(1) 65-70 2011
 9. S Ito, A Natsume, S Shimato, M Ohno, T Kato, P Chansakul, T Wakabayashi, SU Kim. Human neural stem cells transduced with IFN-beta and cytosine deaminase genes intensify bystander effect in experimental glioma. Cancer Gene Ther 17.299-306. 2010
 10. A Natsume, Y Kondo, M Ito, K Momota, T Wakabayashi, J Yohida. Epigenetic aberrations and therapeutic implications in gliomas. Cancer Science 101(6) 1331-1336, 2010.
 11. T Kato, A Natsume, H Toda, H Iwazumi, T Sugita, R Hachisu, R Watanabe, K Yuki, K Motomura, K Bankiewicz, T Wakabayashi. Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells. Gene Therapy 17(11) 1363-1371 2010
 12. M Ohno, A Natsume, H Iwamizu, D Ito, Y Toi, K Iwami, K Noritake, M Ito, K Motomura, J Yoshida, K Yoshikawa, T Wakabayashi. Retrovirally engineered T cell-based immunotherapy targeting type-III variant epidermal growth factor receptor, a glioma-associated antigen. Cancer Science 101(12) 2518-2524 2010
 13. Motomura K, Ogura M, Natsume A, Yokoyama H, Wakabayashi T. A free-radical scavenger protects the neural progenitor cells in the dentate subgranular zone of the hippocampus from cell death after X-irradiation. Neuroscience Letters 485(1) 65-70 2010
- [学会発表] (計 27 件)
1. 若林俊彦 Clinical trial of Interferon-beta and Temozolomide combination therapy for malignant glioma with radiotherapy (JCOG0911; INTEGRA study) 財団法人がん研究振興財団 第 2 4 回国際がん研究シンポジウム 2011. 11. 23-25 東京

2. 若林俊彦 膠芽腫の治療経験から次の戦略を探る 第5回信州脳腫瘍研究会 2011/10/28 松本
 3. 若林俊彦 悪性脳腫瘍治療のブレイクスルーを目指して 南大阪最先端医療研究会 2011/10/22 大阪
 4. 若林俊彦 Sugita scholarship program The 79th AANS 2011. 4. 9-13 Denver
 5. 若林俊彦 悪性脳腫瘍の治療戦略 ノーベルファーマ全体研修会 2011/2/18 東京
 6. 若林俊彦 脳腫瘍治療の近未来を担うシーズを探る 第25回熊本脳神経外科懇話会 2011/2/18 熊本
 7. 若林俊彦 脳神経疾患に対する脳外科医療の現状と今後の展望 大同病院学術講演会 2011/2/12 名古屋
 8. 若林俊彦、夏目敦至、藤井正純、渋井壮一郎 初発膠芽腫に対するIFN- β +テモダール併用化学放射線療法のランダム化第2相試験(JCOG0911:INTEGRA phase II study) 第69回日本脳神経外科学会学術集会 2010. 10. 27-29 福岡
 9. 若林俊彦 悪性脳腫瘍に対する分子標的療法を目指した遺伝子治療の今後の展望 第52回千葉神経外科研究会 2010/10/15 千葉
 10. 若林俊彦 Multimodal treatment strategy for glioma the 4th Indian Japanese Friendship Neurosurgical Meeting 2010. 10. 10-11 Cochin
 11. 若林俊彦 悪性神経膠腫の治療成績向上を目指した治療戦略 第5回青森県脳腫瘍セミナー 2010/9/17 弘前
 12. 若林俊彦 Recent Advanced neurosurgical procedure using integrated system of intraoperative MRI and neuronavigation with multimodal neuroradiological images The 4th harpin international neurosurgical meeting in china 2010 2010. 7. 16-18 ハルピン
 13. 若林俊彦 悪性腫瘍克服の実現に向けて 第3回玄海脳腫瘍セミナー 2010/7/9 博多
 14. 若林俊彦 悪性神経膠腫の術後補助療法の治療戦略 第1回京都脳腫瘍セミナー 2010/7/3 大阪
 15. 若林俊彦 悪性脳腫瘍治療戦略の基礎的研究から臨床最前線まで 第113回山口県脳神経外科懇話会 2010/6/26 宇部
 16. 若林俊彦 悪性脳腫瘍への挑戦: INTEGRA studyに期待すること 第10回高知県脳神経外科研究会 2010/6/25 高知
 17. 若林俊彦 遺伝性脳腫瘍の病理と臨床 第28回日本脳腫瘍病理学会 2010/5/22 大阪
 18. 若林俊彦 脳神経外科領域におけるNano-surgeryへの展開 ナノ学会第8回大会 2010/5/13 名古屋
 19. 若林俊彦、夏目敦至、藤井正純、渋井壮一郎 テモダールをはじめとした化学療法最新の治療成績と今後の展望 第30回日本脳神経外科コンgres総会 2010/5/7 横浜
 20. 若林俊彦 ニューロサイエンスに基づく脳神経外科医療の進歩 奈良県立医科大学脳神経外科教室開講50周年記念講演会 2010/4/24 大阪
 21. 若林俊彦 膠芽腫の生命予後改善に向けた集学的治療の工夫 脳腫瘍治療のUp to date 2010/4/23 愛媛
 22. 若林俊彦 Gene therapy for malignant glioma; Current status and future prospect The 28th annual spring meeting of the Korean Neurosurgical Society 2010/4/9 Busan (釜山)
 23. 若林俊彦 INTEGRA study: 開発の経緯と今後の展望 徳島脳腫瘍セミナー2010 2010/2/22 徳島
 24. 若林俊彦 脳神経外科手術戦略と術後補助療法の今後の展開 第1回沖縄県テモダール講演会 2010/2/5 那覇
 25. 若林俊彦 膠芽腫の世界的標準治療の日本からの発信を目指して 第3回金沢脳腫瘍セミナー 2010/1/30 金沢
 26. 若林俊彦 悪性脳腫瘍に対する先駆的治療戦略 第60回山形脳神経外科懇話会 2010/1/15 山形
 27. 若林俊彦 脳腫瘍診療の現状とPETへの期待 日本メジフィジックス社内講演会 2009/12/25 東京
- 〔図書〕(計7件)
1. メディカ出版 Glioblastoma の治療戦略 若林俊彦 脳神経外科速報 21(1) p 4 - p 16 2011
 2. 化学とマイクロ・ナノシステム研究会誌 脳神経外科領域におけるマイクロ・ナノシステムの臨床への応用 若林俊彦、夏目敦至、藤井正純、吉田純

- 化学とマイクロ・ナノシステム研究会 10(1) p1-p7 2011
3. 田中怜子 免疫細胞治療 II 難治性の悪性グリオーマに対する治療戦略のブレイクスルー (突破口) を免疫治療に期待したい 若林俊彦 幻冬舎
p74-81 2011
 4. 大畑健治 脳腫瘍の外科―社会が望む脳腫瘍外科/術中 MRI 時代の low grade glioma 手術戦略 藤井正純、若林俊彦 ミック 大阪
p143-p152 2011
 5. 宮本享 先達の息吹 若林俊彦 メディカ出版 21(8)
p934-p935 2011
 6. 桑野博行 新しい手術のモダリティ― 前澤聡、藤井正純、若林俊彦 総合医学社 2(4)
p760-p766 2011
 7. 神経膠腫―診断から治療まで― 画像診断と外科治療の融合 若林俊彦、夏目敦至、藤井正純 秀潤社 31(14)
P1378-P1383 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林俊彦 (WAKABAYASHI TOSHIHIKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50220835

(2) 研究分担者

夏目敦至 (NATSUME ATSUSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30362255

鈴木正昭 (SUZUKI MASAOKI)

独立行政法人・理化学研究所・分子イメージング科学研究センター・副センター長
研究者番号：90093046

古山浩子 (KOYAMA HIROKO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50402160

(3) 連携研究者なし