

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25年 5月20日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390277

研究課題名（和文）悪性脳腫瘍に対する薬剤耐性遺伝子を用いた遺伝子・タンパク治療の研究
 研究課題名（英文） Gene and molecular therapy for malignant brain tumors using drug-resistant genes

研究代表者

田宮 隆（TAMIYA TAKASHI）

香川大学・医学部脳神経外科・教授

研究者番号：50252953

研究成果の概要（和文）：今回我々は、薬剤耐性遺伝子の発現と抗がん剤や放射線療法などに対する治療効果を検討し、新しい molecular therapy を開発したいと考えている。悪性グリオーマの薬剤耐性遺伝子・蛋白の発現の状態を初発悪性グリオーマとその再発時について詳細に検討した。さらに Methionine, FLT, FMISO 等の核種を用いた PET 検査と薬剤耐性遺伝子の発現とを臨床症例で検討した。その結果、再発時にはヒト悪性膠芽腫において薬剤耐性遺伝子蛋白特に MDR1, MRP1, MRP2 および ABCG2 において遺伝子発現の増幅が認められた。また悪性脳腫瘍の臨床症例において PET を用いた解析を行い、FLT-PET、Methionine-PET が悪性脳腫瘍に非常に有用でその取り込みは細胞増殖能と相関することに加え、この低酸素領域に集積がみられる FMISO の核種を用いた PET において、その薬剤耐性遺伝子蛋白の発現や悪性度と正の相関が認められることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We would like to examine the relationship between the therapeutic efficacy of radiation therapy or anti-cancer drugs and expression of drug resistance gene, in order to develop a new molecular therapy. We examined in detail the time of initial and recurrence state of expression of drug resistance gene-protein of malignant glioma. We also examined the relationship between expression of the drug resistance gene and PET studies using radionuclide methionine, FLT, and FMISO. As a result, the amplification of the gene expression was observed in the ABCG2 and MDR1, MRP1, MRP2 especially drug resistance gene protein in human malignant glioblastoma at the time of relapse. In addition, analyzes using PET study in clinical cases of malignant gliomas, the uptake of FLT and methionine correlate with cell proliferation of malignant gliomas. In addition, the uptake of FMISO positively correlated with the expression of the drug resistance gene protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
23年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
24年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

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：ABCG2, MGMT, Glioblastoma, Positron emission Tomography, Methionine, FLT, FMISO

1. 研究開始当初の背景

我々は薬剤耐性遺伝子 (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, ABCG2, MGMT, Topo II α など) に注目し研究を行ってきた (Cancer Res 57:5086-92, 1997, Cancer Res 59:8-13, 1999, Genes Chromosomes Cancer 27:110-6, 2000, Jpn J Cancer Res, 92:778-84, 2001, Jpn J Cancer Res. 2001 Sep;92(9):968-74, Jpn J Cancer Res 92:1133-7, 2001, Brain Tumor Pathol 21:57-61, 2004、以後研究業績参照)。また、臨床においても先進医療「薬剤耐性遺伝子検索による悪性脳腫瘍の化学療法」を実施しており、薬剤耐性の発現と脳腫瘍治療に対する抵抗性、予後についてのデータを蓄積から、悪性グリオーマの薬剤耐性が発現が増幅が、治療に抵抗性で予後が不良であることを臨床で明らかとした (投稿中)。これらの臨床データから、薬剤耐性の発現を変化させる、特に抑制させることが、治療抵抗性を変化させ予後の改善に繋がる可能性が示唆され、基礎的研究を開始している。我々は薬剤耐性遺伝子 (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, ABCG2, MGMT, Topo II α など) に注目し研究を行ってきた (Cancer Res 57:5086-92, 1997, Cancer Res 59:8-13, 1999, Genes Chromosomes Cancer 27:110-6, 2000, Jpn J Cancer Res, 92:778-84, 2001, Jpn J Cancer Res. 2001 Sep;92(9):968-74, Jpn J Cancer Res 92:1133-7, 2001, Brain Tumor Pathol 21:57-61, 2004、以後研究業績参照)。また、臨床においても先進医療「薬剤耐性遺伝子検索による悪性脳腫瘍の化学療法」を実施しており、薬剤耐性の発現と脳腫瘍治療に対する抵抗性、予後についてのデータを蓄積から、悪性グリオーマの薬剤耐性が発現が増幅が、治療に抵抗性で予後が不良であることを臨床で明らかとした。また、さらに治療効果に関連が予想される様々な遺伝子 (IDH1, CD133, VEGF, VEGF-R, YKL-40 など) の発現を検討してきた。また、我々の教室では、以前より PET 検査を用いて種々の分子イメージングの研究を行っており、多くの知見を得て報告してきた (Eur J Nucl Med Mol Imaging 35:2009-2017, 2008, J Neurooncol 99, 217-225, 2010, Eur J Nucl Med Mol Imaging 38:441-450, 2011, Mol Imaging Biol 13:1284-1289, 2011, その他研究業績参照)。また、Methionine, FLT, FMISO, PIB, FMZ などの新しい核種を用いた PET 検査の施行に関しては既に我々の施設で倫理委員会の許可を得ている。これらの実績や経験を応用して、悪性脳腫瘍の薬剤耐性遺伝子の発現のみならず分子生物学的特性と治療効果を明らかとし、種々の核種 (FDG, Methionine, FLT, FMISO など) を用いて得られた分子イメージ

ングを詳細に検討し、これらの関係を明らかとし、テーラーメイド治療に繋がる新しい分子イメージング法を確立する。また、薬剤耐性遺伝子の発現状態を正確に画像化するために薬剤耐性遺伝子の抗体を用いて独自の新しい PET 用の核種を作成し、あるいはこれらの分子生物学的特性を正確に反映した新しい核種の作成を基礎的に行い、将来臨床応用を目指して、新しい分子イメージング法を確立したい。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍、特に悪性神経膠腫に対する抗がん剤治療は、治療抵抗性であり、その要因の 1 つとして脳内血管内皮細胞における血液脳関門の関与が考えられている。一方、腫瘍細胞には ABC スーパーファミリー (MDR-1, MRP1, MRP2, MRP3, ABCG2) あるいは MGMT などの薬剤耐性遺伝子と言われている遺伝子の発現により、抗がん剤に対して耐性が獲得され、治療抵抗性に関与している。この ABC スーパーファミリーの一部の遺伝子は、正常脳内血管内皮細胞にも発現し、血液脳関門の機能を担っていると報告されている。もともと悪性神経膠腫は、血管が豊富であり、血管内皮細胞の増生が認められている。この腫瘍内の血管内皮細胞の新生には、血管新生因子である VEGF などの発現に関与している。この血管新生因子は、腫瘍の低酸素領域において発現し、腫瘍の増殖や薬剤耐性など治療抵抗性に関与している。以上より腫瘍内血管内皮細胞に関連した因子が治療抵抗性に関与していると考えられ、今回、我々は以下の点に注目し、検討を行った。1) 悪性神経膠腫における ABC スーパーファミリーを中心に遺伝子発現を検討した。2) 悪性神経膠腫における血管新生因子である VEGF の発現と ABC スーパーファミリーの発現を比較し、それぞれの発現による予後について比較した。3) 悪性神経膠腫における初発時と再発時において VEGF の発現と ABC スーパーファミリーの発現を比較し、検討を行った。4) VEGF などが関与している低酸素領域を示す分子イメージング、特に FMISO を用いた PET 検査と ABC スーパーファミリーの発現を比較した。一方、陽電子断層撮影法 (PET) を用いた悪性脳腫瘍の分子イメージングとしてアミノ酸代謝を評価するメチオニン (MET) と核酸代謝を評価するフルオロチミジン (FLT) が用いられている。我々は MET と FLT の集積は脳腫瘍の悪性度や細胞分裂能と相関することを報告してきた。今回の研究では、MET と FLT の集積がそれぞれの移送体である large amino acid transporter-1 (LAT-1) と equilibrative nucleoside transporter 1

(ENT1) の組織における発現と相関するか否かを検討した。また FLT の集積には組織における thymidine kinase-1 (TK-1) による FLT のリン酸化が関与することが知られており、FLT の集積と組織における TK-1 の発現との相関についても検討した。

3. 研究の方法

- 1) 2009 年 4 月から 2012 年 4 月まで 41 例の初発グリオーマを対象とした。性別は、男性 21 例、女性 20 例であり、年齢は、26 歳から 86 歳まで、平均 50.4 歳である。
- 2) グリオーマの症例は、WHO 分類の Grade II が 7 例であり、diffuse astrocytoma は 5 例、oligodendroglioma は 1 例、oligoastrocytoma は 1 例である。WHO 分類の Grade III は 14 例であり、anaplastic astrocytoma は 9 例、anaplastic oligodendroglioma は 1 例、anaplastic oligoastrocytoma は 4 例である。WHO 分類の Grade IV は 20 例であり、glioblastoma は 19 例、gliosarcoma は 1 例である。
- 3) 遺伝子の発現は、RT-PCR を用いて、ABC スーパーファミリー (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, ABCG2)、MGMT、Topo II α 、CD133 を測定した。
- 4) ABC スーパーファミリーの中でも、特に ABCG2 遺伝子に注目し、ABCG2 遺伝子の発現と CD133、VEGFR1 および VEGFR2 の発現を比較検討した。
- 5) ABCG2 遺伝子の発現と無再発期間を比較検討した。
- 6) 41 例の症例の中で、再発が認められ再手術を行った 6 例において、MDR1、ABCG2、MGMT、CD133、VEGFR1 および VEGFR2 の発現を初発時と再発時で比較検討した。
- 7) 41 例に対して FMISO-PET 検査を施行し、T/B 比 (腫瘍内の FMISO の集積/血清中の FMISO の活性) と ABC スーパーファミリー、MGMT、Topo II α 、CD133 遺伝子の発現を比較検討した。(1) 神経膠腫における MET 集積と組織 LAT-1 発現の関連

33 例の初発神経膠腫において術前に MET-PET 検査を行い腫瘍への最大 MET 集積を SUVmax で測定した。手術により最大 MET 集積を示した領域の腫瘍組織を摘出し、LAT-1 と機能的発現に必要な 4F2 cell surface antigen (4F2hc) の免疫組織学的発現を調べ、MET 集積との相関を検討した。

(2) 神経膠腫における FLT 集積と組織 ENT1 発現の関連

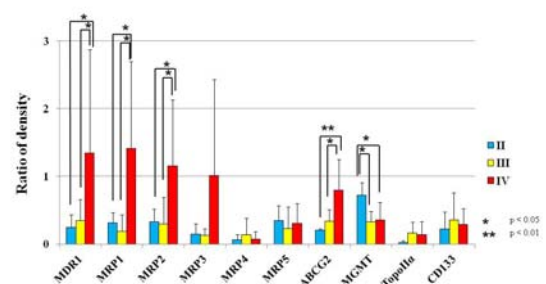
21 例の初発神経膠腫において術前に FLT-PET 検査を行い腫瘍への最大 FLT 集積を SUVmax で測定した。手術により最大 FLT 集積を示した領域の腫瘍組織を摘出し、RT-PCR 法を用いて ENT1 の mRNA 発現を調べ、FLT 集積との相関を検討した。

(3) 神経膠腫における FLT 集積と組織 TK-1 発現の関連

21 例の初発神経膠腫において術前に FLT-PET の動的解析を行い、腫瘍における移送定数 (K1) とリン酸化定数 (k3) を測定した。手術により摘出した腫瘍組織における TK-1 の蛋白および mRNA 発現をそれぞれ免疫組織学的検討と RT-PCR 法により調べ、FLT の K1 および k3 との相関を検討した。

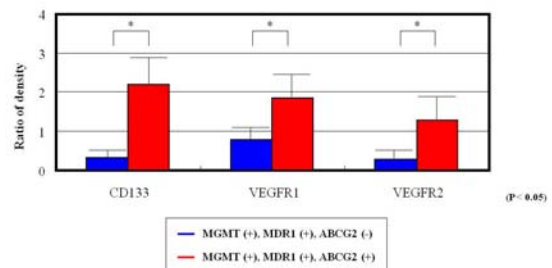
4. 研究成果

- 1) ABC スーパーファミリー (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, ABCG2)、MGMT、Topo II α 、CD133 遺伝子の発現



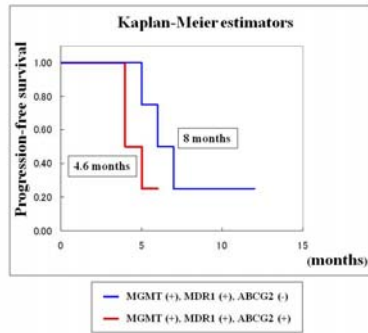
MDR1、MRP1、MRP2 および ABCG2 において、グリオーマの WHO グレード分類が悪性になるにつれ、遺伝子発現の増加が認められた。

- 2) ABCG2 遺伝子の発現と CD133、VEGFR1 および VEGFR2 の発現を比較検討



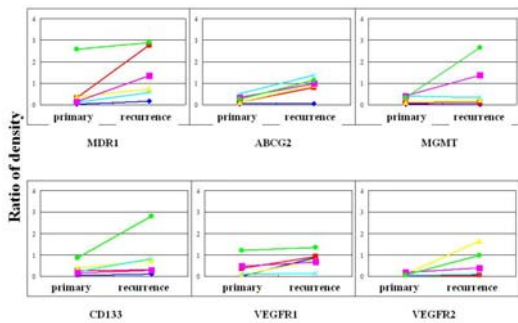
MGMT および MDR1 の発現が認められたグリオーマの症例の中で、ABCG2 の発現が認められた群では、CD133、VEGFR1 および VEGFR2 の発現が認められた。

- 3) ABCG2 遺伝子の発現と無再発期間との比較



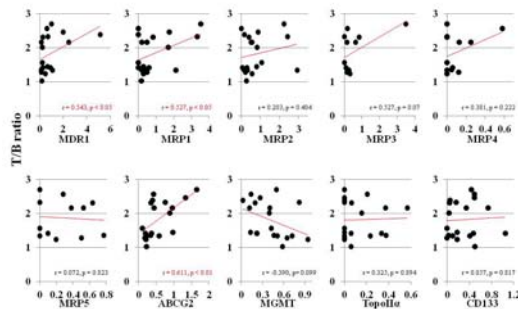
MGMT および MDR1 の発現が認められたグリオーマの症例の中で、ABCG2 の発現が認められた群の無再発期間は 4.6 カ月であり、ABCG2 の発現が認められなかった群は 8 カ月であった。ABCG2 の発現により、有意に再発までの期間が短い結果であった。

4) 初発時および再発時における MDR1、ABCG2、MGMT、CD133、VEGFR1 および VEGFR2 の遺伝子の発現



再発時において MDR1、ABCG2、MGMT、CD133、VEGFR1 および VEGFR2 の遺伝子発現の増加を認めた。

5) FMISO-PET 検査と ABC スーパーファミリー、MGMT、Topo II α および CD133 遺伝子発現との比較



FMISO-PET 検査の T/B 比と ABC スーパーファ

ミリー、MGMT、Topo II α および CD133 遺伝子発現とをそれぞれ比較検討したが、MDR1、MRP1、ABCG2 において T/B 比と遺伝子の発現に正の相関が認められた。

6) 結果のまとめ

- グリオーマの悪性度が高くなるにつれ、MDR1、MRP1、MRP2 および ABCG2 の遺伝子の発現の増加が認められる。
- MDR1 と ABCG2 の発現が認められるグリオーマでは、血管新生因子に関連した VEGFR1 および VEGFR2 遺伝子発現の増加が認められ、再発までの期間も短くなる。
- 再発時には、MDR1、ABCG2、VEGFR1 および VEGFR2 の遺伝子発現の増加が認められた。
- MDR1、MRP1 および ABCG2 の遺伝子の発現と FMISO-PET 検査の FMISO の集積との間には正の相関が認められたことから、FMISO の集積が増加している部位は、薬剤耐性遺伝子発現の増加の点からも治療抵抗性部位であると予測される。

(1) 神経膠腫における MET 集積と組織 LAT-1 発現の関連

腫瘍における MET の最大集積 (SUVmax) は組織 LAT-1 発現とは相関が認められたが、4F2hc 発現との相関は認められなかった。また MET 集積は同時に測定した腫瘍血管密度 (CD34) との相関が認められた。MET の神経膠腫への集積には腫瘍における血管増生と LAT-1 の発現が関連することが明らかとなった。

(2) 神経膠腫における FLT 集積と組織 ENT1 発現の関連

腫瘍における FLT の最大集積 (SUVmax) は組織 ENT1 発現との相関は認められなかった。しかし造影 MRI における腫瘍の増強効果とは有意な関連が認められた。FLT の神経膠腫への集積には、移送体である ENT1 発現では無く、腫瘍における血液脳関門 (BBB) の破綻に伴う FLT 漏出が強く影響していると考えられた。

(3) 神経膠腫における FLT 集積と組織 TK-1 発現の関連

腫瘍における FLT の集積 (SUVmax および T/N 比) は、腫瘍における移送定数 (K1) と相関が認められたが、リン酸化定数 (k3) との有意な相関は認められなかった (図)。FLT の集積は、造影 MRI における腫瘍の増強効果とは有意な関連が認められた。FLT の神経膠腫への集積には、FLT のリン酸化過程とは有意に相関せず、腫瘍における血液脳関門 (BBB) の破綻に伴う FLT 漏出が強く影響していると考えられた。

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8件)

- ① Shinomiya A, Miyake K, Okada M, Nakamura T, Kawai N, Kushida Y, Haba R, Kudomi N, Tokuda M, Tamiya T. 3'-Deoxy-3'-[(18)F]-fluorothymidine ([18)F]-FLT) transport in newly diagnosed glioma: correlation with nucleoside transporter expression, vascularization, and blood-brain barrier permeability. *Brain Tumor Pathol* 査読有 2013 (in press)
- ② Cao WD, Kawai N, Miyake K, Zhang X, Fei Z, Tamiya T. Relationship of 14-3-3zeta (ζ), HIF-1 α , and VEGF expression in human brain gliomas. *Brain Tumor Pathol* 査読有 2013 (in press)
- ③ Yamamoto Y, Ono Y, Aga F, Kawai N, Kudomi N, Nishiyama Y. Correlation of 18F-FLT uptake with tumor grade and Ki-67 immunohistochemistry in patients with newly diagnosed and recurrent gliomas. *J Nucl Med* 査読有 53, 2012, 1911-1915.
- ④ Haining Z, Kawai N, Miyake K, Okada M, Okubo S, Zhang X, Fei Z, Tamiya T. Relation of LAT1/4F2hc expression with pathological grade, proliferation and angiogenesis in human gliomas. *BMC Clin Pathol* 査読有 12, 2012, 4.
- ⑤ Kawai N, Maeda Y, Kudomi N, Miyake K, Okada M, Yamamoto Y, Nishiyama Y, Tamiya T. Correlation of biological aggressiveness assessed by 11C-methionine PET and hypoxic burden assessed by 18F-fluoromisonidazole PET in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 査読有 38, 2011, 441-450.
- ⑥ Okubo S, Zhen HN, Kawai N, Nishiyama Y, Haba R, Tamiya T. Correlation of L-methyl-11C-methionine (MET) uptake with L-type amino acid transporter 1 in human gliomas. *J Neurooncol* 査読有 99, 2010, 217-225.
- ⑦河井信行、三宅啓介、岡田真樹、山本由佳、西山佳宏、田宮 隆。中枢神経原発悪性リンパ腫診断におけるFDG-PETの有用性と限界。脳神経外科 査読有 41、2013、117-126。
- ⑧河井信行、岡内正信、三宅啓介、笹川泰弘、山本由佳、西山佳宏、田宮 隆。非腫瘍性脳病変におけるメチオニン PET。脳神経外科 査読有 38、2010、985-995。

〔学会発表〕(計7件)

- ①三宅啓介、岡田真樹、四宮 あや; 新堂敦; 川西 正彦; 香川 昌弘; 河井 信行; 田宮 隆。膠芽腫における薬剤耐性遺伝子の解析、第11回日本分子脳神経外科学会 2010.8, 仙台
- ②三宅啓介、田宮 隆。Expression of multidrug resistant genes in the human glioblastomas、第69回日本癌学会学術総会 2010.9, 大阪
- ③ 河井信行、三宅啓介、岡田真樹、四宮あや、田宮 隆。初発膠芽腫における¹⁸F-fluoromisonidazoleによる低酸素領域と¹¹C-methionineおよび造影MRI画像との比較。第69回日本脳神経外科学会学術総会、2010年10月、福岡
- ④ 河井信行、三宅啓介、山本由佳、西山佳宏、田宮 隆。¹¹C-methionineと¹⁸F-fluorothymidineを用いた初発神経膠腫の術前診断。第50回日本核医学会学術総会、2010年11月、大宮
- ⑤三宅啓介、岡田真樹、四宮あや、河井信行、田宮 隆。悪性神経膠腫におけるPET検査の有用性 特に薬剤耐性遺伝子との関連について、第49回日本癌治療学会学術総会 2011.10, 名古屋
- ⑥ 河井信行、畠山哲宗、岡田真樹、三宅啓介、山本由佳、西山佳宏、田宮隆。脳腫瘍診断におけるPETによるDNA合成能イメージング: FLTと4DSTの比較。第35回日本脳神経CI学会総会、2012年3月、横浜
- ⑦三宅啓介、岡田真樹、四宮あや、河井信行、田宮 隆。神経膠腫におけるPET検査の有用性 特に薬剤耐性遺伝子との関連について、第50回日本癌治療学会学術総会 2012.10. 横浜

〔図書〕(計2件)

- ①三宅啓介、岡田真樹、河井信行、田宮 隆。日本臨床 68巻 増刊号10、新時代の脳腫瘍学 —診断・治療の最前線—感受性試験に基づく化学療法 2010 p452-p456
- ② Kawai N, Nishiyama Y, Tamiya T: Newly diagnosed glioma: Diagnosis using positron emission tomography with methionine and fluorothymidine, in Hayat MA (ed): *Tumors of the Central Nervous System, Volume 2*. Dordrecht Heidelberg London New York, Springer, 2011, pp 103-112

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~neuron/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田宮 隆 (TAMIYA TAKASHI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50252953

(2) 研究分担者

河井信行 (KAWAI NOBUYUKI)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：40294756

三宅啓介 (MIYAKE KEISUKE)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：40294756

岡田真樹 (OKADA MASAKI)

香川大学・医学部・病院助教

研究者番号：40457346