

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6月25日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591617

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫におけるMGMTの関与しないテモゾロミド耐性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of temozolomide resistance mechanism which is not involved in MGMT in malignant glioma

研究代表者

八代 一孝(YASHIRO KAZUTAKA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20264418

研究成果の概要(和文)：

Glioblastoma(GBM)は、脳腫瘍の中で、最も悪性度が高く、治療困難な悪性腫瘍である。我々は、GBM細胞株でより3つのTMZ耐性株を樹立し、TMZ耐性機序の解明を行った。これらの3つの耐性株では、Mismatch repair(MMR)の構成因子のうち、MLH1の発現が共通して低下していた。MLH1発現低下が耐性獲得への関与していることを確認するためにU251細胞に、MLH1のsiRNAを導入すると、TMZに対する感受性が低下した。さらに、病理組織切片におけるMLH1の発現率を初発群と再発群で解析したところ、再発群でMLH1の発現率が低下しており、MLH1の発現低下は、GBM細胞がTMZに対し耐性を獲得する一機構である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Background: Treatment with the alkylating agent temozolomide (TMZ) has resulted in benefits for patients with glioblastoma (GBM). Nevertheless, almost all GBMs recur and lead to death of the patient. It is therefore critically important to determine the mechanisms of acquisition of TMZ resistance. **Methods:** To analyze the mechanism of TMZ-resistance of gliomas, we isolated three TMZ-resistant human glioma U251 cell lines. We examined mRNA expression of mismatch repair (MMR) components of the TMZ-resistant cells and evaluated the expression of MutL homolog 1 (MLH1), with immunohistochemically in GBM specimens obtained from patients who had undergone total or subtotal tumor removal and who suffered from recurrence during administration of TMZ. **Results:** We found that MLH1 mRNA and protein expression was decreased in all three independent TMZ-resistant cell lines compared to the parental cells and that knock-down of MLH1 expression decreased the TMZ sensitivity of the parent cells. Moreover MLH1 expression was reduced in the recurrent human GBMs during administration of TMZ compared to the level in the initial tumor. **Conclusions:** We conclude that U251 glioma cells acquire resistance to TMZ by reducing the expression of MLH1 and that a decrease in MLH1 is associated with the recurrence of GBM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経科学

キーワード：膠芽腫、temozolomide、耐性、MLH1、ABC トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)を発現したGBMの症例では、TMZが効かないことは、よく知られた事実である。しかし、GBM症例の約半数(45.2%)はMGMTの発現の無く、MGMT以外のTMZ耐性機構の解明が非常に重要である。今回われわれは、MGMT発現の無いヒトGBM細胞株(U251)を、TMZを含む選択培地で培養し、限界希釈法で3つのTMZ耐性株を単離した。TMZ耐性株の耐性度は、それぞれ、6.6倍、8.6倍、12.6倍である。これらの細胞株では、親株(U251)も含め、メチル化特異的PCR(MSP)でのMGMTプロモーター領域のメチル化の検討やRT-PCRでのMGMT発現の検討の結果、MGMTの発現は認めていない。このことより、MGMT以外の分子がTMZ耐性に関わっていることを示唆された。

O⁶-methylguanine (O⁶-MeG)、N³-methyladenine (N³-MeA)、N⁷-methylguanine (N⁷-MeG)をTMZはメチル化する。これによりDNA障害が誘発され、細胞周期のチェックポイントが働くことによりapoptosisが誘導される、と考えられている。TMZ処理を行い、細胞周期、subG1、caspase3活性の時間的変化を見たところ、親株(U251)では、時間とともにG2/M arrestが起こり、

subG1が増加するのに対し、耐性株では、細胞周期の停止もsubG1の増加も認めなかった。また、caspase3の活性化も親株(U251)に比べ耐性株では軽度であった。一方、この耐性株は、シスプラチンやエトポシド、ドキシソルビシンといった他の抗癌剤との交差耐性を持っていない。このことより、この耐性株では、なにかしらTMZに対する特異的な耐性機構を持っていると考えられた。

2. 研究の目的

GBMは、脳腫瘍の中で、最も悪性度が高く、治療困難な悪性腫瘍の一つである。近年、GBMに対し、新しい治療薬であるTMZが認可され、一定の治療効果を挙げているが、TMZに対し治療抵抗性を示す例も多く見られている。TMZに対する、耐性機構の解明が重要となっている。我々は、GBM細胞株であるU251細胞を用いて、TMZ耐性株を樹立し、TMZ耐性機序の解明を行った。

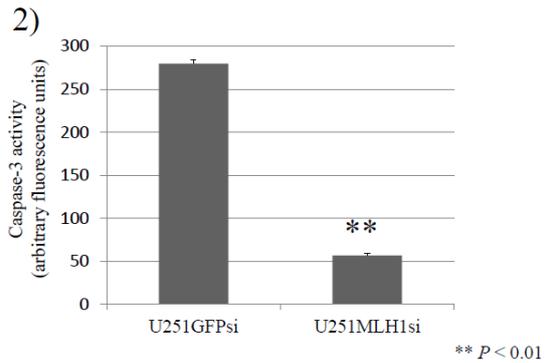
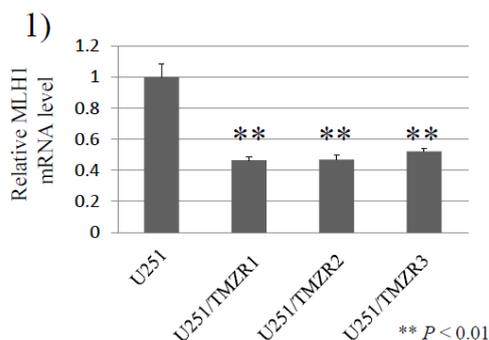
3. 研究の方法

TMZを含む選択培地で、U251細胞から耐性株を単離した。遺伝子発現は、real time-PCRを、タンパク質発現は、Western blot法を用いて検討した。また、MGMTプロモーター領域のメチル化をMSPで評価した。細胞周期は

flow cytometry を用いて、TMZ 耐性度は、MTT assay で評価した。また、apoptosis を、caspase3 activity 測定で評価した。TMZ の細胞内蓄積は、高速クロマトグラフィー (HPLC) を用いて評価した。また、全摘出後に TMZ 投与を行い、その後再発を来した 6 症例 (GBM5 症例、anaplastic astrocytoma 1 症例) の摘出標本における MLH1 の発現率を免疫染色で評価した。

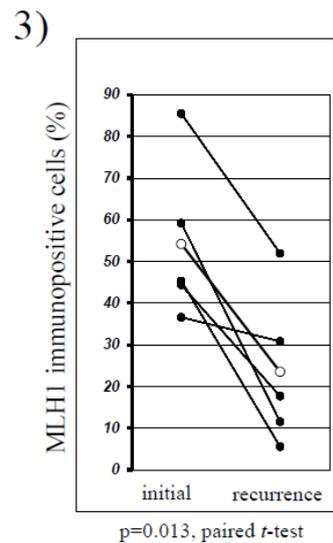
4. 研究成果

TMZ を含む選択培地で U251 細胞を培養し、限界希釈法で 3 つの U251/TMZR1, 2, 3 の 3 つの耐性株を単離した。MTT assay の結果、それぞれの TMZ に対する耐性度はおおよそ、6.6 倍、12.6 倍、8.2 倍であった。また、MSP の結果、U251 株は、既報告同様、MGMT プロモーター領域がメチル化されており、MGMT の発現も見られなかった。耐性株も同様に MGMT の発現は見られず、MGMT プロモーター領域もメチル化されており、MGMT の発現は誘導されていない。また、HPLC により、U251 株と U251/TMZR2 株の細胞内 TMZ 蓄積実験を行った。細胞内 TMZ 蓄積量は、U251 細胞:0.01034fM、U251/TMZR2 細胞:0.01009fM と、差は見られなかった。Mismatch repair (MMR) の構成因子が欠如したり、発現低下した細胞株が TMZ に対し抵抗性を示す、という報告が見られる。今回、作成した耐性株で、MMR 構成因子の発現を real time PCR で検討したところ、3 つの耐性株に共通して、MLH1 の発現が低下して



いることが分かった (Fig. 1)。この結果は、蛋白レベルでも同様であった。また、TMZ 処理を行っても、時間依存的にも、濃度依存的にも、MLH1 の発現が誘導されないことが分かった。MLH1 発現低下が耐性獲得への関与していることを確認するために U251 細胞に、MLH1 の siRNA を導入すると、TMZ に対する感受性が低下した (Fig. 2)。さらに、病理組織切片における MLH1 の発現率を初発群と再発群で解析したところ、初発群 (29.6~85.5%:平均 49.9%)、再発群 (11.5~51.9%:平均 24.8%)、 $p=0.0048 (<0.05)$ と再発群で MLH1 の発現率が低下していた (Fig. 3)。

以上のことより、MLH1 の発現低下が、TMZ 耐性獲得に重要であることが示唆された。どのようにして、TMZ 耐性株で、MLH1 の発現が抑制されているのかを解明することが、TMZ 耐性克服に重要であると考えられた。



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) なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八代 一孝 (YATSUSHIRO KAZUTAKA)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・
客員研究員
研究者番号：20264418

(2) 研究分担者

有田 和徳 (ARITA KAZUNORI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・
教授
研究者番号：90212646

平野 宏文 (HIRANO HIROFUMI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
講師
研究者番号：00264416

古川 龍彦 (FURUKAWA TATSUHIKO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・
教授
研究者番号：40219100