

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16681

研究課題名（和文）メマンチンを用いた膠芽腫新規薬物療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel drug therapy for glioblastoma using memantine.

研究代表者

山田 哲也（Yamada, Tetsuya）

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60816114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,500,000円

研究成果の概要（和文）：MGMT陽性膠芽腫細胞株であるT98G細胞において、NMDA型グルタミン酸シグナル伝達経路がMGMTの転写に与える影響について検討した。N-メチル-D-アスパラギン酸によるNMDA型グルタミン酸受容体の活性化により、T98G細胞のMGMTの発現は上昇し、これはshRNAによるMGMTのノックダウンにより抑制された。NMDA型グルタミン酸受容体の阻害作用を有するMEMを投与すると、MGMT発現が抑制され、TMZによる細胞傷害作用が増強された。

現在はGL261膠芽腫細胞株（MGMT陽性）とC57BL/6マウスを使用した同種同所性マウスモデルを使用し、TMZとMEMの併用効果を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は、本邦の原発性脳腫瘍の11%を占め、最も急速に進行し、予後不良な脳腫瘍の一つである。外科的切除、放射線治療およびテモゾロミド（TMZ）による化学療法が標準治療であるが、未だ膠芽腫患者の予後は不良であり、5年生存率は10%未満とされている。標準治療の中心を担うアルキル化剤であるTMZに関しても、MGMTをはじめとする腫瘍のDNA修復酵素による薬剤耐性が問題となっている。

既承認薬であるメマンチンがMGMTの発現を抑制し、TMZの抗腫瘍効果を増強することを見出したことは、MGMT陽性膠芽腫に対し有効性の高い新規薬物療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Many reports have shown that the glutamate signaling pathway plays a major role in the growth and progression of GBM. However, the role of NMDA-type glutamate receptors in GBM TMZ resistance remains unclear. In this study, we evaluated the relationship between glutamate signaling pathways via NMDA-type glutamate receptors and TMZ resistance. Using T98G cells, an MGMT-positive human GBM cell line, we examined the effect of the NMDA-type glutamate signaling pathway on MGMT transcription. The results showed that activation of NMDA-type glutamate receptors by N-methyl-D-aspartate increased MGMT protein expression in T98G cells, and this expression was suppressed by MGMT knockdown by shRNA, and enhanced the cytotoxic effect of TMZ.

We are currently investigating the combined effects of TMZ and MEM in an allogeneic mouse GBM model using the mouse GBM cell line GL261 (MGMT positive) and C57BL/6 mice.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：膠芽腫 メマンチン 新規薬物療法

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、現在も予後不良の悪性原発性脳腫瘍であり、外科的切除、放射線治療および化学療法による集学的治療が標準治療である。脳という組織の特性上、病変周囲の拡大切除には自ずと限界があり、化学療法の有効性が予後に大きく影響することに疑いの余地は無い。2006年のテモゾロミド承認以降、膠芽腫患者の予後はある程度改善したものの、主にMGMTに起因するテモゾロミド耐性機序の存在が現在の臨床上の問題となっている。標準治療で治療した際の2年生存率は、MGMT陰性膠芽腫の48.9%に対し、MGMT陽性膠芽腫では14.8%に過ぎず、明らかにMGMT陽性膠芽腫の予後は不良である。テモゾロミドの承認以降、「テモゾロミドに代わる新薬」あるいは「テモゾロミドとの併用で膠芽腫患者の生存期間を延長する薬剤」はいずれも開発されておらず、MGMT陽性膠芽腫に対する有効性の高い治療法の開発が急がれる。

2. 研究の目的

メマンチンはNMDA型グルタミン酸受容体の阻害剤であり、膠芽腫の増殖・浸潤に重要な役割を果たすグルタミン酸経路を阻害する。これまでに、メマンチンの単独投与は*in vitro*では膠芽腫細胞に対し抗腫瘍効果を有するものの、*in vivo*においては有意な抗腫瘍効果を示さないことが報告されている。また、渉猟しえた限りでは、メマンチンを含むNMDA型グルタミン酸受容体阻害剤が、MGMT発現を抑制するという報告や、テモゾロミドの抗腫瘍効果を増強するという報告はない。現在の標準治療の中心であるテモゾロミドによる化学療法では十分な抗腫瘍効果を得られないMGMT陽性膠芽腫に対して、メマンチンを併用することで、より有効性の高い新規併用薬物療法を開発することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

アルツハイマー型認知症の治療薬であるメマンチンが、*in vitro*で膠芽腫細胞のMGMT発現を抑制し、テモゾロミドの抗腫瘍効果を増強することが、本研究では既に確認されていた。

よって、メマンチンがMGMT陽性膠芽腫のMGMT発現の抑制を介してテモゾロミドの抗腫瘍効果を増強する際の分子メカニズムを明らかにし、臨床的に応用可能な併用薬物療法の開発を目指すこととし、具体的には以下の2項目を中心に研究を進めた。

1). メマンチンがMGMT発現を抑制する機序の検討

MGMT陽性ヒト膠芽腫細胞株T98Gを使用し、メマンチンがMGMT陽性膠芽腫細胞に対するテモゾロミドの抗腫瘍効果を増強する際の分子メカニズムを明らかにした。まず、Western Blotting法を用い、アポトーシス関連マーカー(PARP, bcl2)、細胞増殖関連マーカー(cyclinD1)を測定し、テモゾロミドへのメマンチンの追加が誘導するのが腫瘍細胞死であるのか、腫瘍増殖抑制であるのかを明らかにした。また、DNA損傷マーカー(γ H2AX)を測定し、テモゾロミドによるDNAアルキル化(DNA損傷)がメマンチンの併用時に増強されるか否かを評価した。次いで、メマンチンがMGMT遺伝子の転写に与える影響を評価した。これは、転写関連の細胞内シグナルタンパク(P13K, AKT, mTOR, およびNFkB)をWestern Blotting法で評価し、MGMTのmRNA発現を定量リアルタイムPCR法で評価した。

2). MGMT陽性膠芽腫マウスモデルにおけるテモゾロミドとメマンチンの併用効果の検討

膠芽腫マウスモデルを使用し、テモゾロミドとメマンチンの併用投与の有効性を明らかにした。当研究室では、C57BL/6Jマウス由来のマウス膠芽腫細胞株GL261(MGMT陽性)をC57BL/6Jマウスの脳内に移植した同種同所性モデルを確立していたので、これを使用した。

メマンチンの投与方法に関しては、全身投与による評価に加え、生体内分解性ポリマーMedGel®を使用し、メマンチンの腫瘍内局所投与での評価を行った。具体的には、移植日をDay0とし、対照群(n=24)、テモゾロミド単独投与群(n=24, 50mg/kg, Day14-18, 経口投与)、メマンチン単独全身投与群(n=24, 60mg/kg, Day13-18, 経口投与)、メマンチン単独局所投与群(n=24, 0.4mg/匹, Day13, 経頭蓋で腫瘍内投与)、テモゾロミド+メマンチン全身投与群(n=24, 用法・用量は単独群と同様)、およびテモゾロミド+メマンチン局所投与群(n=24, 用法・用量は単独群と同様)の5群を設定し、Day20に、各群12匹をpentobarbitalで麻酔し、4% paraformaldehyde含有0.2M phosphate bufferを用いて灌流固定し、脳切片を作製し、腫瘍体積を測定した。残りの各群12匹は生存期間を観察した。さらに、脳切片のMGMTタンパクを免疫染色し、腫瘍内発現量を定量して、*in vivo*でのメマンチンの作用を評価した。

4. 研究成果

MGMT陽性のヒト膠芽腫細胞株であるT98G細胞において、NMDA型グルタミン酸シグナル伝達

経路が MGMT の転写に与える影響について検討した。結果、N-メチル-D-アスパラギン酸による NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化により、T98G 細胞の MGMT タンパクの発現が上昇し、これは shRNA による MGMT のノックダウンにより抑制された。NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害作用を有するメマンチンを投与すると、T98G 細胞における MGMT 発現が抑制され、テモゾロミドによる細胞傷害作用が増強されることが判明した。

現在は GL261 マウス膠芽腫細胞株 (MGMT 陽性) と C57BL/6 マウスを使用した同種同所性マウス膠芽腫モデルを使用し、テモゾロミドとメマンチンの併用効果を検討しているが、in vivo で十分な効果は確認できていない。投与経路および投与量を調整しつつ検討を継続している。

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 1件）

1. 著者名 Tsuji Shohei, Nakamura Shinsuke, Shoda Kenji, Yamada Tetsuya, Shimazawa Masamitsu, Nakayama Noriyuki, Iwama Toru, Hara Hideaki	4. 巻 160
2. 論文標題 NMDA receptor signaling induces the chemoresistance of temozolomide via upregulation of MGMT expression in glioblastoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 375 ~ 388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-022-04154-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜大学医学部脳神経外科 https://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/index.html

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
---------	---------