

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791617

研究課題名(和文) グリオーマに対するテモゾロミド耐性獲得の機序並びに化学療法剤増感法の検討

研究課題名(英文) Evaluation of acquired resistance to temozolomide in a human glioma cell line

研究代表者

安達 一英 (Adachi, Kazuhide)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：10338056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトグリオーマ細胞におけるTMZ耐性獲得の機序を解明する目的に行った。まずTMZ耐性株作成を行い、耐性株ではG2/M arrestを生じておらず、colony formation assayにおいてTMZ耐性が獲得されていることが確認された。TMZ耐性獲得とG2/M arrest阻害との関係を明らかにする目的でcdc2リン酸化の検討を行った。その結果耐性株ではG2/M arrestは起こっていない群と、一過性に生じていると考えられる群が認められた。次にBRCA1とTMZ耐性獲得の関係を検討した。U87MGとTMZ耐性株において、BRCA1の発現に差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the mechanism of acquired temozolomide (TMZ) resistance in a human glioma cell line (U87MG). First, we generated a TMZ-resistant (TR) cell line. We then treated the TR cell line with TMZ and confirmed the suppression of G2 arrest and TMZ resistance using fluorescence-activated cell sorting analysis and a colony formation assay, respectively. Next, we examined the expression pattern of phosphorylated-cdc2 (Tyr15, Tyr161) to reveal the relationship between acquired resistance of TMZ and suppression of G2 arrest. Our results suggested that the TR cell line contains two types of cells: one that shows suppression of G2 arrest and another that shows transiently induced G2 arrest. Finally, we considered the relationship between genetic mutations in BRCA1 and acquired TMZ resistance. Western blotting analysis showed no significant difference in the expression of BRCA1 between the parental U87MG and TR cell lines.

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：glioma temozolomide drug resistance

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは原発性脳腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍であり、その治療には手術療法だけでは無く、放射線・化学療法を中心とした補助療法を必要とする。我々は新世代 DNAメチル化剤 temozolomide(TMZ)のヒトグリオーマ細胞に対する主要な効果が G2/M arrest に伴う mitotic catastrophe であることを示し (Hirose et al: Cancer Res,2001) それに伴う効果も臨床的に示され現在のグリオーマにおける補助療法の中心になりつつあるが、耐性を獲得し再増大を来してくる腫瘍が多いのも事実である。我々の研究室による知見ではヒトグリオーマ細胞における TMZ 耐性獲得の機序として G2/M arrest 阻害によるものが考えられたが判然としていない。また TMZ 耐性グリオーマに対する治療も、臨床的に行き詰っており、化学療法増感法としてははっきりとしたものは存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトグリオーマ細胞における TMZ 耐性獲得の機序、並びに、TMZ 耐性ヒトグリオーマ細胞における化学療法剤の効果を増強させる為の標的分子を同定し、更に臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

(1) ヒトグリオーマ細胞が TMZ 耐性を獲得する機序として G2/M arrest 阻害が関与しているのかを詳細に検討する

(2) TMZ 耐性ヒトグリオーマ細胞において UCN-01 (ChK1 阻害剤;スタウリスポリン誘導体)処理を行うことにより、cdc のリン酸化が早期より抑えられることから、TMZ 長期投与に伴い、BRCA1 が変異をおこし、ChK1 活性を低下させ、G2/M arrest を抑制していることが考えられたため、ヒトグリオーマ細胞における、TMZ 耐性獲得への BRCA1 変異の関与について検討する。

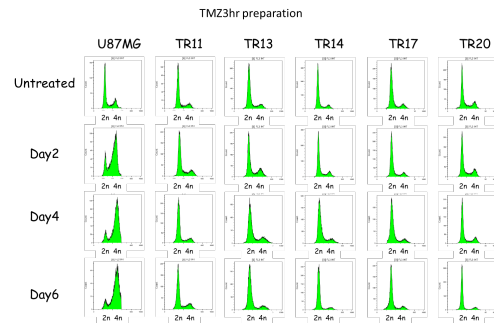
3. 研究の方法

- (1) TMZ 耐性株の作成をする。
- (2) TMZ 耐性獲得と G2/M arrest 阻害との関係を明らかにする目的で cdc2 リン酸化 (p-cdc2(tyr15),p-cdc2(tyr161))の検討を行う。
- (3) U87MG と TMZ 耐性株における BRCA1 の発現程度の違いの検討をする。

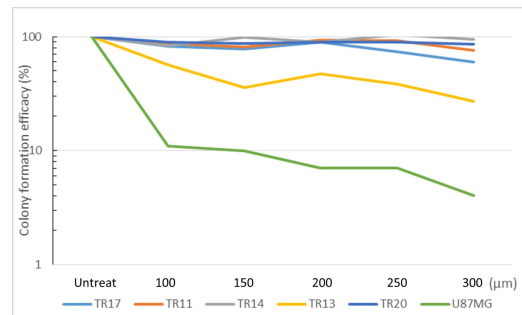
4. 研究成果

(1) ヒトグリオーマ細胞の TMZ 耐性株作成を行った。U87MG 由来の TMZ 耐性株作成のために 7 日の間隔で TMZ による処理 (順次濃度増加) を行い 3 カ月間分離培養することにより計 5 株の U87MG 由来 TMZ 耐性細胞株を分離獲得することができた。その細胞に TMZ 処理を行い、FACS を用いて検討した。U87MG では G2/M arrest を生じるが、耐性株では G2/M arrest を生じてい

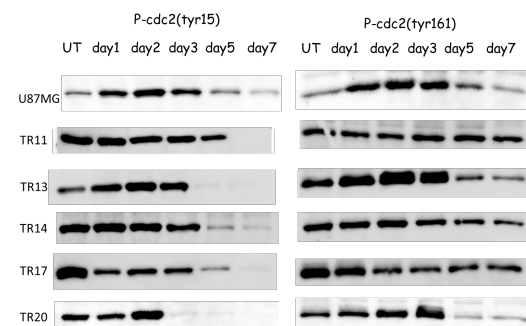
ないことを確認した。



(2) また TMZ に対する耐性獲得の程度を調べるために U87MG, TMZ 耐性株を TMZ 処理した状態で培養し colony formation assay を行った。その結果 U87MG と比して有意に TMZ 耐性を獲得していることが確認された。



(3) TMZ 耐性獲得と G2/M arrest 阻害との関係を明らかにする目的で cdc2 リン酸化 (Tyr15, Tyr161) の検討を行った。G2/M 期 check point における cell cycle の回転は、S 期に合成された cyclinB が cdc2 と複合体を形成し、主に G2 期にはこの複合体は細胞質内に存在しているが、G2 終了期に核内移行することにより行われている。cdc2 リン酸化には高リン酸化と低リン酸化状態があり、高リン酸化型 (Tyr14, Tyr15, Tyr161) は細胞質内に存在し、低リン酸化型 (Tyr161) は核内に存在している事から、ただリン酸化の検討を行うだけでは活性・不活性の判定が困難と考えられる為、そのリン酸化の違いを詳細に検討した。U87MG と TMZ 耐性株それぞれに TMZ を 3hr 処理し、その後 day1,2,3,5,7 と培養し p-cdc2(tyr15), p-cdc2(tyr161) の western blotting 法を行った。



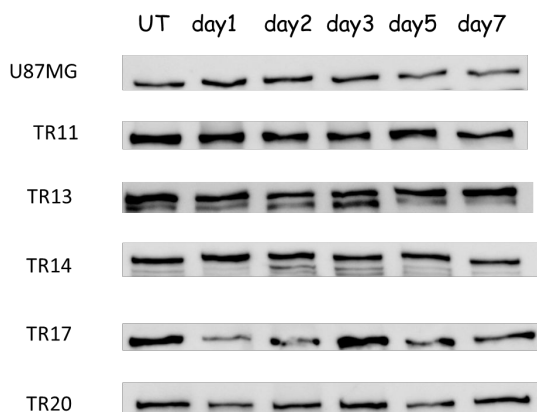
U87MG においては TMZ 投与により P-cdc2(tyr15)は day1 ~ day3 まで発現が上昇し、P-cdc2(tyr161)は day1 ~ day5 まで上昇し、その後投与前の状態に発現は戻る。このことは G2/M arrest を生じていることを反映していると考えられた。次に TMZ 耐性株においては、TMZ 投与後 Tyr15 はいずれの群も day5 以降からその発現は枯渇した。TR11, TR14, TR17 においては TMZ 処理を行わない状態において pcdc2(tyr15)は U87MG に比して発現が高かった。TMZ 処理を行うと同群においては、P-cdc2(tyr15)、P-cdc2(tyr161)の両発現の上昇は見られず、G2/M arrest は生じていないと考えられた。また TR13, TR20 においては TMZ 処理によって U87MG と同様に発現パターンを示したが、前述したように、tyr15 においては day5 には枯渇するレベルまでに低下していた。このことはいったん G2/M arrest を生じたが、すぐにその状態を回復していることが示唆された。また耐性株における tyr15 の枯渇は cell cycle を G2/M 以外で arrest を生じている可能性も示唆された。

(4) U87MG と TMZ 耐性株における BRCA1 の発現の検討

BRCA1 変異に伴って BRCA1 蛋白が枯渇することにより ChK1 活性が低下し、G2/M arrest が抑制されることによって TMZ への耐性を獲得している事が考えられた。

そこで TMZ 耐性ヒトグリオーマ細胞と U87MG 細胞を、TMZ にて細胞処理を行い、薬剤処理細胞および薬剤未処理細胞を用いて、BRCA1 蛋白の発現変動を western blot 法を用いて評価し、BRCA1 遺伝子の変異の可能性について検討した。

U87MG と TMZ 耐性株において、TMZ を 3hr 投与して培養し、その後 day1~7 まで培養し適宜 BRCA1 の western blotting 法を行った。



BRCA1 の発現は、U87MG 細胞においても TMZ 耐性ヒトグリオーマ細胞においても明らかな差は認められなかったが、今後リン酸化 BRCA1 の検討は必要と考えられた。

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 2 件)

J Neurooncol. 2013 Aug 13. [Epub ahead of print](**査読あり**)The Cdk inhibitor flavopiridol enhances temozolomide-induced cytotoxicity in human glioma cells. Hayashi T, Adachi K, Ohba S, Hirose Y.

Brain Tumor Pathol. 2013 Apr 20. [Epub ahead of print](**査読あり**)

Subgrouping of gliomas on the basis of genetic profiles Hirose Y, Sasaki H, Abe M, Hattori N, Adachi K, Nishiyama Y, Hayashi T, Hasegawa M, Yoshida K.

〔学会発表〕(計 1 件)

18th Annual meeting of the Society for Neuro-oncology 2013.11.22 (San Francisco) P o s t e r

Consideration of relationship between genetic abnormality and clinical picture in glioma without +7 and -1p/19q

Kazuhide Adachi, Hikaru Sasaki, Shinya Nagahisa, Kouichirou Yoshida, Natsuki Hattori, Yuya Nishiyama, Tsukasa Kawase, Mitsuhiro Hasegawa, Masato Abe, Yuichirou Hirose

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

安達 一英 (Adachi Kazuhide)

藤田保健衛生大学 医学部

研究者番号 : 10338056

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :