

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462277

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対するDNA修復機構阻害による抗癌剤増感治療法の開発

研究課題名(英文) Novel strategy to enhance temozolomide sensitivity with interference of base excision DNA repair system for malignant glioma

研究代表者

永根 基雄 (Nagane, Motoo)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60327468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は極めて悪性でテモゾロミド(TMZ)による標準治療後も再発は必至である。TMZはMGMTが耐性を規定するO6-メチルグアニンを形成するが、殆どはN7-及びN3-メチル体を形成する。これをPARPが修復促進するため、PARP阻害剤(ABT888)によるTMZ感受性亢進が期待される。ヒト膠芽腫のMGMTメチル化及び非メチル化細胞株、再発株、TMZ耐性株でTMZ+ABT-888併用はTMZ単剤より強く、相乗的細胞傷害を認めた($p < 0.05 \sim 0.001$)。また照射単独に比べ照射+ABT-888併用でも相乗的抑制がみられ、ABT-888は耐性機序によらずTMZ耐性を克服する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GBM) is highly malignant and intractable to standard temozolomide (TMZ) treatment. TMZ induces cytotoxic O6-methylguanine lesion in tumor cell DNA, which is repaired by MGMT leading to TMZ resistance. TMZ preferentially induces N7-methylguanine and N3-methylalanine lesions, but they can be repaired through base excision repair system where poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) plays a central role. Thus interference with PARP would be expected to conquer TMZ resistance. We treated human GBM cell lines with PARP inhibitors (ABT888) with or without TMZ and found that combination of TMZ plus ABT888 significantly strengthened cell death in GBM cell lines with methylated MGMT but also in those with unmethylated MGMT compared to either treatment alone. This synergistic effect was further observed in GBM cell lines derived from TMZ refractory patients as well as TMZ-resistant subclones. These results suggest the potential clinical usefulness of combining PARP inhibitors to TMZ.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍 神経膠腫 PARP阻害剤 テモゾロミド耐性

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍の代表疾患である膠芽腫は極めて悪性で、現在の標準治療薬であるアルキル化剤のテモゾロミド (temozolomide, TMZ) 治療によっても再発は必至であり、再発後の標準治療は未だ確立していない。従って、TMZ 耐性の分子機序の解明ならびに耐性克服を標的とした新規治療法の確立が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍の代表である悪性神経膠腫 (グリオーマ) は近年の画期的な医療の進歩にも拘らず、依然難治で予後が極めて不良な疾患である。その原因のひとつに化学療法への耐性の存在があり、耐性の克服が臨床上極めて重要な課題と考えられる。1. 悪性神経膠腫治療の標準治療薬はアルキル化剤であるテモゾロミド (Temozolomide, TMZ) であるが、DNA 修復酵素 O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) が高発現する腫瘍細胞では TMZ による O6-methylguanine を介する治療効果が減弱し、早期に再発・増悪を来す。2. 今回、我々は TMZ による他の DNA メチル化病巣 (N3, 7-methylpurines) に注目し、3. その病巣修復上中心的役割を果たす PARP-1 が、乳癌などで重要な分子標的として阻害剤が臨床応用されつつあることから、4. PARP を主として阻害することで TMZ による細胞傷害効果を増強し、耐性の克服を図るとともに、他の化学療法剤や細胞死誘導治療との相乗効果につき検討・解析することを目的とする。

1. 永根基雄: No Shinkei Geka 35:433, 2007; 2. 永根基雄: 脳神経外科速報 20:188, 2010; 3. Gerson SL: Nat Rev Cancer 4:296-307, 2004; 4. Drew Y, Plummer R: Drug Resist Updat 12:153, 2009

3. 研究の方法

(1) 各細胞株の MGMT 遺伝子プロモーターメチル化の有無については、pyrosequencing による定量的 CpG island のメチル化状態を解析した。初発、再発を含む様々な MGMT メチル化 (MGMT 非発現) 膠芽腫細胞株と MGMT 非メチル化 (MGMT 発現) 細胞株を用いた。

(2) 各細胞株に対して、PARPi であり血液脳関門透過性が良好であり、PARP1、PARP2 に作用する ABT-888 の感受性試験を行った。

ABT-888 または、TMZ 及び ABT-888 を各種濃度で培地に添加後 8 日間培養し、MTS アッセイで評価した。薬剤相乗作用は CompuSyn® ソフトウェアを用いて解析した。

MGMT メチル化細胞株と MGMT 非メチル化細胞株を TMZ 存在下 (15 μM から徐々に増量) に 6 か月以上継続培養し、TMZ 耐性株を作製した。各細胞株の TMZ 耐性は MTS アッセイにて確認後、同様に TMZ+ABT-888 併用治療を行った。ABT-888 投与 5 時間後に放射線照射

を行い、10~14 日培養し固定した後、形成されたコロニー数を計測した。

(3) 細胞株 (U87, U87TMZ 耐性株など) をマウスの皮下に植えて脳腫瘍モデルを作成する。腫瘍が一定の大きさになった時点でコントロール群、TMZ 単剤投与群、ABT-888 単剤投与群と ABT-888 + TMZ 投与群にわけて、それぞれ加療を行う。腫瘍径、容積を測定し、生存曲線は Kaplan-Meier 法で解析を行う。治療後の腫瘍を摘出し、TMZ 治療効果に関連する分子の発現状態等を検討する。

4. 研究成果

(1) 膠芽腫細胞株の MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態

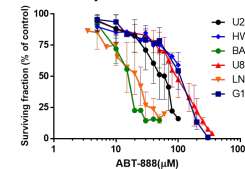
TMZ に対する感受性を規定する主因子と考えられている MGMT メチル化状態を、pyrosequencing 法により検討した。メチル化状態の判定は、検索された CpG islands のメチル化サイト割合 8% をカットオフ値とし、8% 未満を非メチル化、8% 以上をメチル化として行った (50-52)。使用した 10 種類のヒト膠芽腫細胞株において、U251、HW1、BAH1、U87、LN229、G18 は MGMT メチル化ありと判定された。一方、G28、G13、WK1、RN1 の各細胞株では非メチル化と判定された。

	MGMT-methylated promotor cell lines (%)	MGMT- unmethylated promotor cell lines (%)
LN229	87	RN1 5
BAH1	40	G13 3
U251	53.2	WK1 4
U87	86.4	G28 3
HW	100	
G18	10	

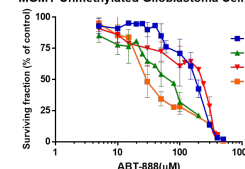
(2) 各膠芽腫細胞株に対する ABT-888 単剤の抗腫瘍効果

ABT-888 の抗腫瘍効果をみるため、ABT-888 各濃度における膠芽腫細胞株各種の感受性試験について MTS アッセイを用いて行った。各細胞株での IC50 を求めた結果、MGMT メチル化細胞株群では平均 66.4 μM、MGMT 非メチル化細胞株群では 123.1 μM であった。MGMT メチル化細胞株の方が比較的感受性が良い傾向を示したが、有意差は認められなかった (t-test, P=0.2215)。

MGMT-Methylated Glioblastoma Cell Lines



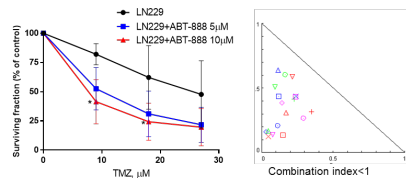
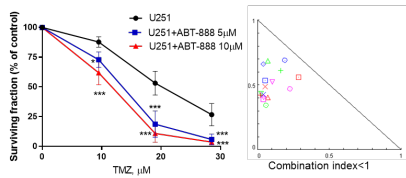
MGMT-Unmethylated Glioblastoma Cell Lines



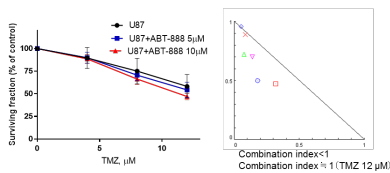
MGMT-methylated promoter cell lines IC ₅₀ (μM)		MGMT-unmethylated promoter cell lines IC ₅₀ (μM)	
LN229	18.7	RN1	30.7
BAH1	40.4	G13	49.4
U251	53.2	WK1	178.1
U87	86.4	G28	234.0
G18	99.7		
HW1	100.0		
Average ± SEM	66.4 ± 13.86	Average ± SEM	123.1 ± 49.14

t-test, P=0.2215

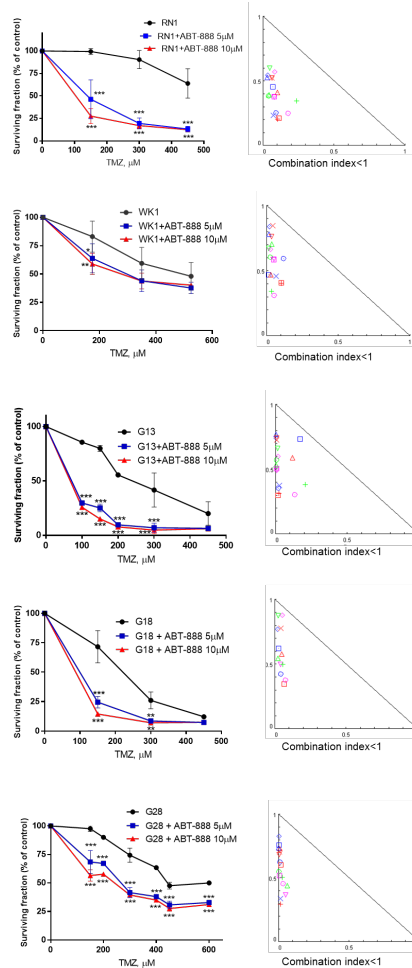
(3) ABT-888 併用 TMZ 療法の相乗的抗腫瘍効果
MGMT メチル化細胞株である U251 と LN229、U87 に対して、TMZ 単剤治療と TMZ + ABT-888 (5 μM, 10 μM) 併用療法を行い感受性の変化を観察した。MGMT メチル化細胞株の内、U251、LN229 においては、単剤では影響が乏しい ABT-888 の 5 μM, 10 μM 付加することにより TMZ 単剤治療と比較して有意に細胞障害の増強が認められた (U251; p<0.001, LN229; TMZ 9 および 18 μM と ABT-888 10 μM の併用において p<0.05)。CompuSyn® で CI を算出し検討すると、いずれの組み合わせも CI < 1 となり、相乗効果があることが示された。



一方、U87 では併用療法による有意差は認められなかった。

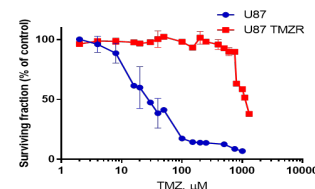
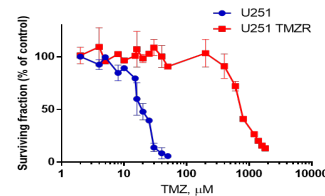


MGMT 非メチル化細胞株では RN1 と WK1、および再発細胞株 (非メチル化) の G13 と G18、G28 においても、U251、LN229 と同様に有意な細胞障害の増強があり (RN1; p<0.001, WK1; TMZ 175 μM と ABT-888 5 μM の併用において p<0.05, TMZ 175 μM と ABT-888 10 μM の併用において p<0.01, G13; p<0.001, G18; TMZ 150 μM と ABT-888 5 および 10 μM において p<0.001, TMZ 300 μM と ABT-888 5 および 10 μM において p<0.01, G28; p<0.001) ABT-888 付加による相乗効果が認められた。



(4) TMZ 耐性株の樹立と ABT-888 併用 TMZ 療法の相乗効果

PARPi による TMZ 耐性克服をより直接的に検証するため、TMZ 存在下で長期間培養し、TMZ 治療後も生存し増殖を続ける TMZ 耐性ヒト膠芽腫株を複数株樹立した。この TMZ 耐性株における TMZ 耐性を MTS アッセイで確認した。TMZ に対する IC₅₀ 値で比較をすると、TMZ 感受性である U251 では親株 21 μM、耐性株 677.5 μM (32 倍)、U87 では親株 18.2 μM、耐性株 1,121.4 μM (62 倍) と、大幅に IC₅₀ が変化しており、TMZ に対して強い耐性を獲得していることが示された (U251, U87: p<0.0001)。



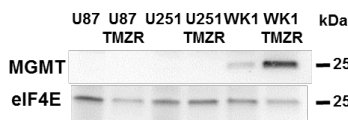
TMZ に中等度耐性を示す WK1 についても、IC₅₀

は親株 409.1 μM から耐性株 818.6 μM (2倍) となり、U251 や U87 と比較すると軽度ではあるが、同様に TMZ 耐性の獲得が認められた(WK1: $p < 0.05$)。

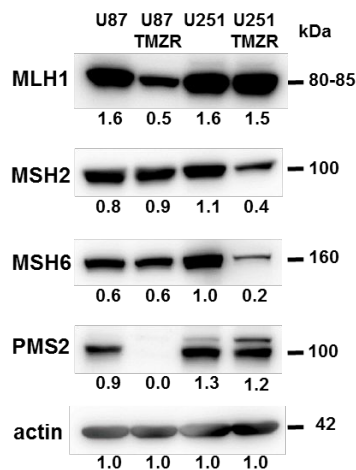
次に、これらの細胞株における ABT-888 に対する感受性を検討した。U251, WK1 では TMZ 耐性株の方が ABT-888 に対する感受性が認められたが、U87 では逆に TMZ 耐性株で ABT-888 に耐性を示し、TMZ 耐性化と ABT-888 に対する感受性の変化は連動せず、一定しなかった。

TMZ 耐性化の機序を明らかにするため、MGMT 状態を各親株と TMZ 耐性株のペアで検討した。MGMT メチル化の有無を pyrosequencing で測定したところ、TMZ 耐性獲得前後ではいずれの細胞株においても MGMT メチル化の有無に変化は認められなかった。

一方、immunoblotting にて MGMT 蛋白発現を比較したところ、MGMT が非発現である U251, U87 では、親株と耐性株のどちらにも MGMT 蛋白発現は認めなかったが、MGMT 非メチル化株であり、MGMT 蛋白を発現している WK1 では、TMZ 耐性株において MGMT 発現が増強しており、本株における TMZ 耐性化に関連していることが示唆された。

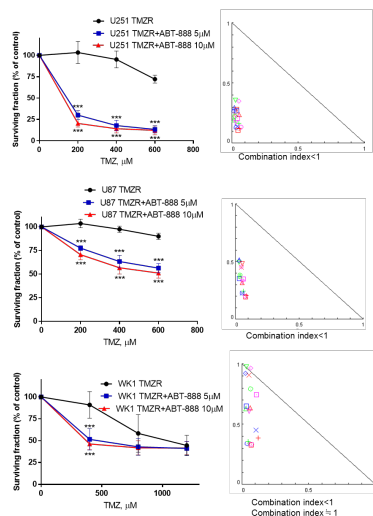


さらに MMR 機構の各遺伝子の蛋白発現についても immunoblotting で検討した。MMR に関与する MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 の発現度は、TMZ 耐性獲得前後で U87 では PMS2 の発現欠損および MLH1 の発現低下が、U251 では MSH6 と MSH2 の発現低下が認められた。

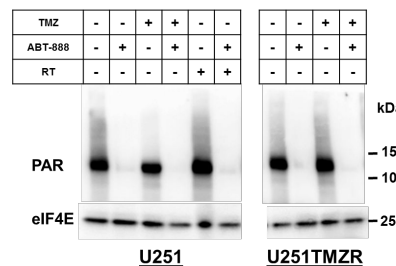


次に、これらの TMZ 耐性株を用いて、同様の TMZ + ABT-888 併用療法を行った。いずれの TMZ 耐性細胞株においても、TMZ 単剤治療では強い耐性を呈したが、ABT-888 を 5 μM または 10 μM 付加することにより、良好な相乗的殺細胞効果が認められた (U251TMZR, U87TMZR; $p < 0.001$ かつ $CI < 1$, WK1TMZR; TMZ 400 μM において ABT-888 5 および 10 μM で

$p < 0.001$, TMZ 400 および 800 μM において $CI < 1$, TMZ 1,200 μM において $CI = 1$)。



U251 の親株と TMZ 耐性株を用いて、各治療 (TMZ 10 μM , 放射線治療 (6 Gy)) と ABT-888 5 μM の添加による PAR の産生を immunoblotting により検出したところ、どちらの細胞株においても、PAR の産生は TMZ の影響をほとんど受けず (U251 親株では放射線照射によっても) ABT-888 の投与により PAR はほぼ検出未満のレベルに低下した。この結果から、ABT-888 は確かに PARP の機能を抑制し、その作用は細胞の TMZ 耐性度には影響されないことが示唆された。

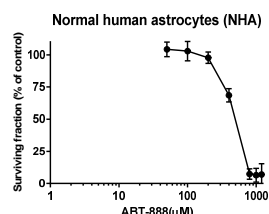
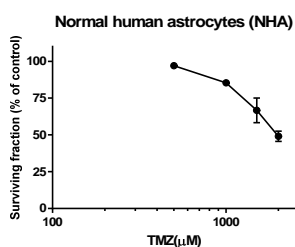


(5) ABT-888 による放射線照射の細胞傷害性に対する増強効果

TMZ による DNA 傷害の他に、悪性神経膠腫治療における標準治療の一つをなす放射線治療による DNA 傷害に対しても PARPi が効果を増強するか、次に検討した。MGMT メチル化細胞株 (U251, LN229) MGMT 非メチル化細胞株 (WK1, RN1) 再発細胞株 (G28) を用いて、放射線治療を各線量で照射し、ABT-888 の有無による治療効果の違いをコロニー形成能アッセイにて評価した。いずれの細胞株においても、ABT-888 を投与することで放射線照射による殺細胞効果の増強が認められ、その増強効果は線量が大きくなるほどより顕著に認められた。

(6) TMZ と ABT-888 による正常細胞に対する細胞傷害性

NHA を用いて IC50 について検討した。NHA に対する TMZ の IC50 は 1466.1 μM で、ABT-888 の IC50 は 492.3 μM であった。



今回使用した各種膠芽腫細胞株と比べていずれも高い IC50 値を示した。両者の併用でも相乗効果は認められず、これらの治療による正常細胞傷害の程度は低いことが示唆された。

(7)マウス脳腫瘍モデルでの効果

上記ヒト glioma 細胞株をヌードマウス脳内に移植し、ABT888、TMZ を単剤・併用で治療した。安定した腫瘍モデルが作成困難で、ABT888、併用効果の検証は現時点では未確認である。今後の追加実験が必要と考えられる。

結論: ABT888 は TMZ 抵抗性 glioma 細胞に TMZ と相乗的感受性亢進作用を認め、治療抵抗性膠芽腫の新規治療方法となる可能性が示唆された。

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 34 件)

1. Aihara K, Mukasa A, Nagane M (20 番目), Abratani H, Saito N (他 19 人): Genetic and epigenetic stability of oligodendrogliomas at recurrence. Acta Neuropathol Comm、査読有、5: 18, 2017DOI 10.1186/s40478-017-0422-z
2. Yamagishi Y, Maruyama K, Kobayashi K, Kume S, Sasaki N, Yokoya S, Saito K, Shiokawa Y, and Nagane M: Black hairy tongue after chemotherapy for malignant brain tumors. Acta Neurochir、査読有、159: 169-172, 2017. Published online: 23 November 2016. doi:10.1007/s00701-016-3036-5
3. Arita H, Yamasaki K, Nagane M (45 番目), Ichimura K (他 50 人): A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. Acta Neuropathologica Communications、査読有、4:79, 2016, DOI 10.1186/s40478-016-0351-2.
4. Tsuchihashi K, Nagane M (16 番目), Saya

H, and Nagano O (他 19 人): The EGFR receptor promotes the malignant potential of glioma by regulating amino acid transport system xc(-). Cancer Res、査読有、76 (10): 2954-2963, 2016. Published Online First March 15, 2016; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2121

5. Nitta Y, Shimizu S, Shishido-Hara Y, Suzuki K, Shiokawa Y, Nagane M: Nimotuzumab enhances temozolomide induced growth suppression of glioma cells expressing mutant EGFR *in vivo*. Cancer Med、査読有、5 (3): 486-499, 2016. 2016 Jan 18. doi: 10.1002/cam4.614.
6. 永根基雄: 脳腫瘍に対する immune checkpoint 阻害薬の開発状況 腫瘍内科、査読無、17 (1): 20-27, 2016
7. 永根基雄: Astrocytic tumors (星細胞腫系腫瘍)—脳腫瘍 Update .脳神経外科、査読有、44 (1): 71-89, 2016
8. Muragaki Y, Nagane M (5 番目), Shibui S: Multicenter retrospective study to compare chemoradiotherapy with temozolomide or acnu in 535 anaplastic gliomas. Neuro-Oncology、査読有、17(suppl 5):v6-v6 · November 2015, DOI: 10.1093/neuonc/nov206.23
9. Saito K, Shimizu S, Suzuki K, Kobayashi K, Sasaki N, Kume S, Shiokawa Y, Nagane M: Mismatch Repair defects predict clinical outcome of primary and recurrent malignant gliomas (abstr MTR-16, NO-0433). Neuro-Oncology、査読有、17(suppl 5):v127-v127 · November 2015, DOI: 10.1093/neuonc/nov219.16
10. Mukasa A, Nagane M (12 番目), Saito N (他 11 人): DNA methylation profile analysis of gliomas revealed a change in methylation status during malignant progression (abstr No 1072). Cancer Research、査読有、75(15 Supplement):1072-1072 · August 2015
11. Feng H, Nagane M (7 番目), Cheng S-Y (他 21 人): EGFR Phosphorylation of DCBLD2 Recruits TRAF6 and Stimulates Akt-promoted Tumorigenesis. J Clin Invest.、査読有、2014 Sep 2;124(9):3741-56. doi: 10.1172/JCI73093 PubMed PMID: 25061874. Pubmed Central PMCID: 4151226
12. Nagane M: Dose-dense temozolomide – Is it still promising? Neurol Med Chir (Tokyo)、査読無、55: 38-49, 2015, doi: 10.2176/nmc.ra.2014-0277, online December 20, 2014
13. 永根基雄: 悪性神経膠腫に対する抗血管新生療法と課題. 癌と化学療法、査読無、41 (2): 141-147, 2014
14. 永根基雄: 再発膠芽腫 .脳 21、査読無、17 (1): 20-28, 2014

15. Saito K, Mukasa A, Nagae G, Nagane M, Aihara K, Takayanagi S, Tanaka S, Aburatani H, Saito N: Identification of distinct subgroup of glioma and novel genes related to malignant progression by genome-wide methylation analysis (abstr OM-062). *Neuro-Oncology*, 査読有、15 Supplement 3: iii150, 2013
 16. Nozue-Okada K, Nagane M, McDonald KL: Combining PARP inhibitors with TMZ: Improved efficacy observed in recurrent patient-derived cell lines compared to primary cells (abstr ET-073). *Neuro-Oncology*, 査読有、15 Supplement 3: iii54, 2013
 17. Nagane M, Kobayashi K, Tanaka M, Sato K, Tsuchiya K, Shishido-Hara Y, Shiokawa Y. Predictive significance of mean apparent diffusion coefficient value for responsiveness of temozolomide-refractory malignant glioma to bevacizumab: preliminary report. *Int J Clin Oncol*, 査読有、19: 16-23, 2014; DOI 10.1007/s10147-013-0517-x, 2013
 18. Nagane M, Nishikawa R: Bevacizumab for glioblastoma – a promising drug or not? *Cancers*, 査読無、5(4): 1456-1468, 2013; doi:10.3390/cancers5041456
 19. 永根基雄: グリオーマのアバスチン療法. *Clinical Neuroscience*, 査読無、31 (10): 1182-1184, 2013
- 〔学会発表〕(計 39 件)
1. 永根基雄: WHO2016 update に伴う退形成性神経膠腫の診断・治療上の問題点. 第52回 ニューロオンコロジイの会 新宿, 2017. 1. 14
 2. Narita Y, Nagane M, Kagawa N, Mishima K, Yamamoto T, Wakabayashi T, Hamada T, Odagawa R, Nishimura Y, Kiriyama T, Xiong H, Ocampo C, Nishikawa R: Tolerability and pharmacokinetics (PK) of ABT-414 in Japanese patients (pts) with malignant glioma. *ESMO ASIA 2016*, Singapore, 2016. 12. 17.
 3. Nagane M, Saito K, Kobayashi K, Shimizu S, Suzuki K, Sasaki N, Kume S, Yamagishi Y, Shiokawa Y: Integrated analysis of methylation of *MGMT* promoter and alteration of mismatch repair enzymes in glioblastoma. 13th Asian Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting. Sidney, Australia, 2016. 9. 11-14
 4. 永根基雄 (講演・シンポジウム): 神経膠腫の標準治療と WHO2016 新分類下での治療開発. 第21回日本脳腫瘍の外科学会, 港区, 東京都, 2016. 9. 9
 5. Motoo Nagane (Lecture): Chemotherapy for treatment of high-grade glioma: Any roles to potentiate stereotactic radiotherapy? (in Main debate symposium) 12th International Stereotactic Radiosurgery Society Congress, Yokohama, Kanagawa, Japan, 2015. 6. 8
 6. 永根基雄, 小林啓一, 齋藤邦昭, 塩川芳昭: ベバシズマブ単独療法の再発形態と予後解析. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会, 舞浜市, 千葉県. 2014. 12. 1.
 7. Nagane M, Kobayashi K, Saito K, Shiokawa Y: Recurrent patterns of bevacizumab monotherapy for recurrent primary glioblastoma. The 19th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology. Miami, FL, U.S.A. 2014. 11. 13-16.
 8. 野末恭子, 永根基雄, Ha W, Khasraw M, McDonald KL: PARP inhibitor 併用 TMZ 療法の再発及び temozolomide 耐性膠芽腫細胞株に対する効果. 日本脳神経外科学会第73回学術総会, 品川, 2014. 10. 9
 9. 永根基雄 (基調講演)(シンポジウム): 膠芽腫に対するベバシズマブ治療と効果判定. 第32回日本脳腫瘍病理学会, 徳島, 2014. 5. 24
 10. Okada K, Ha W, Nagane M, Khasraw M, McDonald KL: Combining PARP inhibitors with TMZ improved efficacy observed in recurrent patient-derived cell lines compared to primary cells. 2013 The 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, San Francisco, CA, USA, 2013. 11. 22.
 11. 永根基雄 (教育セミナー). Glioma の遺伝子異常と治療成績. 第31回日本脳腫瘍病理学会, 東京, 2013. 5. 24
- 〔図書〕(計 6 件)
1. 永根基雄: 星細胞腫系腫瘍. in 脳神経外科学 II [改訂12版]. 太田富雄(総編集), 金芳堂, 京都, pp1463-1532, 2016
 2. 永根基雄: 膠芽腫. In 神経症候群 III—その他の神経疾患を含めて— [第2版]. 水澤英洋(編), 日本臨牀社, 東京, 日本臨牀 2014年6月別冊: pp47-52, 2014
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
永根基雄 (NAGANE, Motoo)
 杏林大学・医学部・教授
 研究者番号: 60327468
- (2) 研究協力者
 塩川芳昭 (SHIOKAWA, Yoshiaki)
 岡田恭子 (OKADA, Kyoko)
 清水早紀 (SHIMIZU, Saki)
 鈴木香 (SUZUKI, Kaori)
 マクドナルド, ケリー (McDONALD, Kerrie)