

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10876

研究課題名(和文) 神経膠腫の薬剤感受性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of acquired drug resistance by glioma

研究代表者

廣瀬 雄一 (Hirose, Yuichi)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：60218849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマの薬剤耐性機構を解明するために、細胞株U87MGを低濃度のDNAメチル化剤 temozolimide (TMZ)で反復処理することで耐性細胞株を複数分離し、DNA修復機能についての解析を行った。グリオーマ細胞がTMZ耐性を獲得する上ではDNA脱メチル化酵素の関与は少なく、最も強い耐性はDNAミスマッチ修復機構(MMR)の発現低下によって得られた。特にGTミスマッチの修復に関与するMSH6タンパクの発現低下が重要であり、これらMMR異常細胞においてはTMZに対する再感受性化は不可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル化剤 temozolimide (TMZ)は悪性グリオーマの治療の中心になるや薬剤であるが、その耐性機構として従来からDNA修復酵素O6-methylguanine methyltransferase (MGMT)の発現が重視されてきた。しかし我々の検討では、TMZ耐性獲得の上ではDNAミスマッチ修復機構(MMR)の異常がより重要な意義を持ち、様々な薬剤で処理を行ってもTMZに対する再感受性化は認められなかった。グリオーマ細胞のTMZ耐性は繰り返す薬剤処理に基づくMMR異常によって獲得されるため、治療早期に強力な治療を加えることが腫瘍進行の抑制に貢献するとの考察を得た。

研究成果の概要(英文)：Temozolomide (TMZ) is a main therapeutic drug for malignant glioma which is representative brain tumor. induces prolonged arrest of human glioma cells in the G2/M phase and inhibition of the G2 checkpoint intensifies the effect of TMZ. These findings suggest that the G2 checkpoint is linked to DNA repair mechanisms. To clarify the mechanism of TMZ resistance, we established TMZ-resistant (TR) clones by serial treatment of U87MG cells with TMZ. We evaluated TMZ-induced cell cycle arrest and the effect of various G2 checkpoint inhibitors. We observed that longer exposure (over 6 months) to TMZ enriched the proportion of TR clones that underwent only minimal G2 arrest following TMZ treatment compared to short exposure (4 months) to TMZ. Expression of MSH6 was reduced in these clones. None of the G2 checkpoint inhibitors could resensitize TR clones to TMZ. Longer drug treatment may induce resistance of cells to DNA damaging agent(s) by means of mismatch repair modification.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 DNAメチル化剤 薬剤耐性 DNAミスマッチ修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表的な原発性脳腫瘍である浸潤性神経膠腫(グリオーマ)を外科的手術のみで根治することは一般的には不可能である。特に最も悪性度の高い膠芽腫においては、化学療法も含めた補助療法の有効性を改善することが必要である。DNAメチル化剤テモゾロミド(temozolomide, TMZ)の導入は化学療法に一定の進歩をもたらしたものの、同剤を用いても膠芽腫の平均生存期間はわずか数ヶ月延長したのみであり、更に様々な分子標的薬が開発されつつある現在においても同腫瘍の根治に向けた有効な治療法は確立していない。

TMZはDNA中のグアニンのO⁶位にメチル基を付加する作用を持つ。O⁶位メチル化グアニン自体は重篤なDNA損傷ではないが、O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)の活性が十分でない細胞においてO⁶位メチル化グアニンが存在することでDNA複製の段階でグアニン・チミン(GT)ミスマッチが形成される。このGTミスマッチをDNA mismatch repair system (MMR)が感知してチミンは除去されるが、O⁶位メチル化グアニンが存在する限りその対側にはチミンが取り込まれ続けるためGTミスマッチを解消することができずにGTミスマッチからチミン除去に至る過程を繰り返すことになる。TMZ投与の結果この不毛なサイクルが繰り返されることになり、やがてATP枯渇とDNA二重鎖断裂に至り、細胞毒性につながると考えられている。なお、TMZはグアニンN⁷位とアデニンN⁵位もメチル化するが、その細胞毒性はO⁶位メチル化によるところが大きいとされている。

この過程においてTMZが細胞毒性を発揮するにはMMRが十分に機能する必要があるが、このDNA修復機構はG2/M checkpointと密接に関連することが示唆されている。G2/M checkpointはDNA損傷に反応してchk1, chk2, cdc25, cdc2といったタンパク質を介して働き、G2期における細胞周期の停止(G2/M arrest)を引き起こす。TMZに暴露されたグリオーマ細胞ではG2/M arrestが生じていることが知られており、G2/M checkpointの活性化は一般的な反応と考えられる。G2/M arrestは損傷したDNAを修復するための「時間稼ぎ」につながる細胞保護機構の一つと考えられており、化学療法剤によりDNAに損傷を受けた細胞の生存を考える上で重要なポイントである。

2. 研究の目的

TMZに対する耐性機構の一つとしてMGMTによるDNAの脱メチル化が挙げられる。MGMTはTMZにより形成されるO⁶位メチル化グアニンからメチル基を除去することでDNA修復を行うため、MGMTが高発現している細胞においてはTMZの効果が期待できない。しかし膠芽腫の45-75%ではMGMTプロモーター領域のメチル化とともに発現が低下していると報告されており、MGMTの発現が低下している膠芽腫でもTMZ使用に伴い耐性を獲得するに至る事を考えると、MGMT以外の因子によるTMZ耐性機構の解明が治療効果改善のためには必要と考えられる。

そこで悪性グリオーマの薬剤耐性機構を解明するとともに将来の新規治療法開発の基盤を作ることを目的にグリオーマ細胞の生物学、特に腫瘍特異的なDNA修復機構に関する検討を行った。

3. 研究の方法

1) 細胞培養及び薬剤投与：細胞株はヒトグリオーマ細胞株U87MGを用いた。培養液は10%ウシ胎児血清添加Dulbecco's Modified Eagle Mediumを用いて37°C、5%CO₂の条件下で培養を行ない、薬剤投与の2日以上前に細胞を蒔いた。薬剤は、TMZ (FUJIFILM Wako Chemicals, Osaka, Japan)、Flavopiridol (FP)、Rabuserib (RS)、MK-8776 (MK) (Sellek Chemicals, Houston, TX)を用い、いずれもdimethyl sulfoxideに溶解した。

Western blot や細胞周期の検討を行う際は細胞周期非同期の細胞に対して TMZ(100 μ M)で 3 時間反応させ、続けて薬剤を含まない培養液を用いて洗浄・培養し、必要な期間をあけて細胞を回収した。全ての細胞回収は subconfluent の状態で行なった。

Colony formation efficiency の際は TMZ (50 μ M or 100 μ M、3 時間)、FP (50nM、3 日間)、MK (500nM、3 日間)、RS (250nM、3 日間)をそれぞれ単剤で投与し、FP、RS、MK は TMZ との併用下でも反応させた。TMZ および FP の投与濃度は過去の報告を参考に³⁰⁻³²⁾MK 及び RS は後述の方法で投与濃度を決定した。

- 2) 細胞周期測定：各時点で培養皿に付着した細胞をトリプシン処理し、培養液中に浮遊する細胞と共に回収した。その後リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、70%エタノール(v/v)で固定し、必要であればこの時点で-20°Cで最大 2 週間まで保管した。ついで細胞を PBS で 1 回洗浄し、40 μ g/ml のヨウ化プロピジウム(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)および 200 μ g/ml の RNase A(Sigma-Aldrich)を含む PBS 中で暗所にて室温で 1 時間静置した。染色された核は Becton Dickinson FACSscan (San Jose, CA)または Beckman Coulter Gallios (Brea, CA)を用いて分析した。
- 3) Western blot analysis：タンパク質の調整と Western blot は過去の報告に基づき行なった¹⁷⁾。使用した一次抗体は抗 MGMT (Kamiya Biomedical Co., Tukwila, WA), 抗 tubulin, 抗 MSH2, 抗 MSH6 (いずれも Santa Cruz Biotechnology, inc., Dallas, TX), 抗 β actin, 抗 phosphorylated chk1(P-chk1), 抗 phosphorylated chk2(P-chk2), 抗 phosphorylated cdc2(P-cdc2) (いずれも Cell Signaling Technology, Danvers, MA)である。PVDF 膜上の抗体の発色には enhanced chemiluminescence detection system を用いた。
- 4) Colony formation efficiency：6-well 培養プレートに各 well 500 個の細胞を蒔き、一晚培養した後に前述の条件で各種薬剤(TMZ, FP, RS, MK)を反応させ、薬剤を含まない培養液でコロニー形成させた。薬剤暴露から 15 日後に細胞をメチレンブルーで染色し、50 個以上の細胞を含むコロニーを計測した。同条件で 3 回以上の独立した実験を行った。
- 5) 統計：colony formation efficiency における評価は Mann-Whitney の U 検定を用いた。

4. 研究成果

1) 長期間 TMZ を反復投与することで主に TMZ 誘発性 G2/M arrest が生じない TMZ 耐性株が作成される

今回我々は U87MG に対して 2 週間毎に 10 μ M \rightarrow 25 μ M \rightarrow 50 μ M \rightarrow 100 μ M \rightarrow 200 μ M と徐々に TMZ 投与濃度を上げながら 3 時間投与し、最終的に 200 μ M/2 週間で TMZ を反復投与することで TMZ 耐性株を作成した。作成した耐性株はいずれも Colony formation efficiency にて U87MG と比較して TMZ 耐性が得られていることを確認した。更に作成した耐性株の TMZ 反応性を確認する目的で TMZ 100 μ M, 3hr で処理したのちに day1, 2, 3, 4, 5 で細胞周期を確認したところ、一時的な TMZ 誘発性 G2/M arrest が生じる耐性株と TMZ 誘発性 G2/M arrest が生じない耐性株を認め、同様の方法で作成した耐性株でも TMZ への反応性が異なることが確認された。

ここで、TMZ を 6 ヶ月以上の長期に渡って投与して耐性株を作成すると、4 株中 4 株と高頻度で TMZ 誘発性 G2/M arrest が生じない耐性株 (TR11, TR14, TR17, TR20) が作成された。これらの TMZ 誘発性 G2/M arrest(-)の耐性株はいずれも colony formation efficiency により TMZ 耐性化が得られていることを確認した。

2) TMZ 誘発性 G2/M arrest (-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)では TMZ 処理後に chk1, chk2, cdc2 のリン酸化が生じない

一般に細胞が分裂する際には複数の cell cycle checkpoint を通過する必要があるが、特に G2/M checkpoint においては DNA 損傷が存在すると chk1, chk2 のリン酸化が誘導され、その結果 cdc2 の脱リン酸化が生じなくなり細胞は G2 期から M 期に移行することができなくなる⁶⁻¹⁶⁾。

そこで、U87MG と TMZ 誘発性 G2/M arrest (-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)を TMZ 100 μ M で 3 時間処理した後に day0, 1, 2 でそれぞれ細胞を回収、タンパク質を抽出し、G2/M checkpoint において主要な働きを持つ P-chk1(Ser345)、P-chk2(Thr 68)、P-cdc2(Tyr15)の発現を western blot にて検討した。

その結果、U87MG では TMZ 処理後に継続的に上記リン酸化タンパクの発現が増加するのに対し、耐性株ではいずれも発現増加が確認されず、これは耐性株において G2/M arrest が生じていないことと矛盾しない結果と考えられた。

3) TMZ 誘発性 G2/M arrest (-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)ではいずれの株も MGMT の発現がなく、更に MMR 関連タンパクである MSH2 と特に MSH6 の発現低下を認めた

今回の実験で使用している TMZ 誘発性 G2/M arrest (-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)における MGMT の発現を western blot で確認したところ、U87MG 及び耐性株はいずれも MGMT の発現を認めず、本耐性株は MGMT によらない耐性化が得られていると考えられた。

次に、TMZ の作用機序から考えると TMZ が毒性を発揮するには正常に機能する MMR が必要となる。そこで、MMR 異常が MGMT によらない TMZ 耐性化に繋がっている可能性を考慮し、U87MG と TMZ 誘発性 G2/M arrest (-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)において MMR 関連タンパクである MSH2, MSH6 の発現を western blot で検討した。その結果、U87MG ではいずれのタンパクも発現していたが、耐性株は MSH2 と特に MSH6 の発現低下を認めており、MMR 機能不全が TMZ 耐性の原因となっていると考えられた。

4) TMZ 誘発性 G2/M arrest (-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)は cdc2 阻害薬である FP による TMZ 耐性解除が得られない

FP は G2/M check point で主要な働きを持つ cdc2 を阻害する薬剤である。我々は以前、U87MG において FP を TMZ と併用することにより、その cdc2 阻害作用を介して TMZ 誘発性 G2/M arrest が増強されること、U87MG に対する TMZ 毒性を増強させること、U87MG 由来の TMZ 耐性株に対しても TMZ 感受性を回復させること、FP の Akt 抑制作用が TMZ 耐性解除に繋がっている可能性があることを報告した (J Neurooncol. 2013;115(2):169-78.)。

しかし、その際に使用した耐性株は同じ U87MG 由来かつ本研究で用いたものと同様の方法で作成したものであったが、一時的な TMZ 誘発性 G2/M arrest を認める耐性株を用いており、本実験で使用している TMZ 誘発性 G2/M arrest(-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)とは耐性機構が異なる可能性が考えられた。そこで、先の報告と同様に TMZ 誘発性 G2/M arrest(-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)に対する FP の効果を検討するため、集落形成能における非投薬群に対する TMZ 投与群の比と FP 単独投与群に対する TMZ+FP 併用群を比較することで FP の存在により TMZ の集落形成能抑制効果が増強されるかどうか検討した。

その結果、いずれの耐性株も FP による TMZ 集落形成能抑制効果の増強を認めないことから FP による TMZ 耐性解除は確認されず、先の実験で使用した耐性株と本実験の耐性株は異なる機序で TMZ 耐性化が生じていると考えられた。

5) TMZ 誘発性 G2/M arrest (-)の耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)では chk1 阻害薬使用による

TMZ 耐性解除は得られない

我々は以前、U87MG に対して chk1 阻害薬の UCN-01 を TMZ と併用すると、TMZ 誘発性 G2/M arrest が回避される結果 TMZ の毒性が増強されることを報告した。しかし本実験で使用している耐性株(TR11, TR14, TR17, TR20)はいずれも TMZ による G2/M arrest が生じておらず、chk1 阻害薬による抗腫瘍効果に変化が生じている可能性が考えられた。そこで、chk1 阻害薬である MK, RS を用いて FP と同様にそれぞれ集落形成能における非投薬群に対する TMZ 投与群の比と chk1 阻害薬単独投与群に対する TMZ+chk1 阻害薬併用群を比較することで chk1 阻害薬の存在により TMZ の集落形成能抑制効果が増強されるかどうか検討した。

それぞれの chk1 阻害薬の投与濃度は、データシート上の chk1 に対する IC50(MK 3nM, RS 7nM) の 100 倍以上の濃度まで chk1 阻害薬の濃度を変化させながら TMZ と併用して TMZ 誘発性 G2/M arrest(-)の耐性株のうち代表株 1 株に投与し、colony formation efficiency で抗腫瘍効果が確認された最も薄い濃度を選択した。抗腫瘍効果が得られなかった場合は検討した濃度の中で最も濃い濃度を選択した(data not shown)。いずれの耐性株も TMZ による P-chk1 増加を認めていなかったため耐性株で chk1 阻害効果のコントロールを取ることが難しく、TMZ との併用時に chk1 阻害濃度変化に伴った抗腫瘍効果の変化をもって chk1 阻害効果が得られるだけの十分量が投与できていると判断した。そのため実際に chk1 阻害効果を有する濃度よりも比較的高い濃度での投与となっているものと推測された。

その結果、耐性株においていずれの chk1 阻害薬も TMZ 集落形成能抑制効果の増強を認めず、FP と同様に chk1 阻害によって TMZ 耐性解除は得られないと考えられた。

まとめ・結語

1 : TMZ 反復投与により TMZ 投与に対する G2/M arrest の反応性が異なる耐性株が誘導され、特に長期間 TMZ に暴露させることで主に TMZ 誘発性 G2/M arrest を認めない耐性株が作成される
2 : TMZ 誘発性 G2/M arrest(-)の耐性株では TMZ 処理後に G2/M checkpoint で重要な働きを持つリン酸化タンパクの発現を認めない

3 : TMZ 誘発性 G2/M arrest (-)の耐性株は MGMT 発現を認めない一方で MSH2 及び特に MSH6 の発現低下を認め、TMZ が効果を発揮する上で必要な mismatch repair system (MMR)の機能異常が TMZ 耐性につながっている

4 : MMR 機能異常による TMZ 耐性を獲得した TMZ 耐性株に対して chk1 阻害薬や cdc2 阻害薬といった G2/M checkpoint を修飾する薬剤を投与しても TMZ 耐性は解除されない

といった実験結果が得られた。

これらの結果から、TMZ 耐性株作成過程において TMZ 暴露期間が長期になるとその耐性機構を変化させながら TMZ 耐性が強固に進む可能性が示され、今後の TMZ 耐性に関する基礎研究および臨床試験では複数の TMZ 耐性機構が存在することを認識し、腫瘍の遺伝学的背景の差に基づいた細やかな検討及び TMZ 耐性機構の違いを意識した治療の最適化が必要と考えられた。また、MMR 異常を認める TMZ 耐性株においては MMR を介する経路での TMZ 耐性解除は困難と考えられ、強固な TMZ 耐性を獲得した腫瘍をターゲットとして治療効果改善を狙うよりは、より低進行度の段階での化学療法最適化が治療効果改善を考える上で有効である可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohba S, Hirose Y	4. 巻 51
2. 論文標題 Association between mutant IDHs and tumorigenesis in gliomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 194-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-018-0189-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamashiro K, Nakao K, Ohba S, Hirose Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Human glioma cells acquire temozolomide resistance after repeated drug exposure via DNA mismatch repair dysfunction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1315-1323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14073.	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Hirose Y, Yamashiro K, Ohba S.
2. 発表標題 Attempts to overcome drug resistance of malignant glioma.
3. 学会等名 The 3rd Symposium of World Federation of Neuro-Oncology Societies（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城慧、大場茂生、中尾一貴、廣瀬雄一
2. 発表標題 ヒトグリオーマ細胞株を用いた悪性グリオーマにおける temozolomide耐性機構の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城慧、大場茂生、中尾一貴、廣瀬雄一
2. 発表標題 G2/M arrestから見た悪性グリオーマにおけるTemozolomide耐性機構の検討
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城慧、大場茂生、中尾一貴、廣瀬雄一
2. 発表標題 Temozolomide誘発性G2/M arrestから見た悪性グリオーマにおけるTemozolomide耐性機構の検討
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohba S, Hirose Y.
2. 発表標題 PARP inhibitor, inhibition of homologous recombination, or dianhydrodulcitol can overcome temozolomide-resistance in glioma cells.
3. 学会等名 Society for Neuro-oncology, 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohba S, Hirose Y.
2. 発表標題 Inhibition of homologous recombination, PARP inhibitor, or dianhydrodulcitol overcomes temozolomide-resistance in glioma cells.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research, 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場茂生、廣瀬雄一
2. 発表標題 テモゾロマイド耐性グリオーマに対する治療法
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場茂生、廣瀬雄一
2. 発表標題 テモゾロマイド耐性グリオーマに対する治療法
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬雄一, 大場茂生, 山城 慧, 中江俊介, 安達一英, 西山悠也, 長谷川光広
2. 発表標題 培養細胞による研究から示唆された初発膠芽腫に対する化学療法増強法の重要性
3. 学会等名 一般社団法人 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuichi Hirose
2. 発表標題 Drug resistance after long exposure to temozolomide is acquired through enhanced DNA repair by homologous recombination and inactivation of DNA mismatch repair
3. 学会等名 The 22nd International Conference on Brain Tumor Research and Therapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuichi Hirose
2. 発表標題 Correlation between genetic subgrouping and chemotherapy sensitivity of gliomas.
3. 学会等名 5th Quadrennial Meeting of World Federation of Neuro-Oncology Societies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shigeo Ohba, Yuichi Hirose
2. 発表標題 Inhibition of homologous recombination resensitizes temozolomide-resistant glioma cells to temozolomide
3. 学会等名 5th Quadrennial Meeting of World Federation of Neuro-Oncology Societies (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	安達 一英 (Adachi Kazuhide) (10338056)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	
研究分担者	佐々木 光 (Sasaki Hikaru) (70245512)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	
研究分担者	大場 茂生 (Ohba Shigeo) (80338061)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	