

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09004

研究課題名(和文) 神経膠腫アルキル化剤治療後の高度点変異誘導機序解明による個別化療法の開発

研究課題名(英文) Development of individualized therapy by elucidation of molecular mechanisms for hypermutation phenotype induced by treatment with alkylating agents in glioma

研究代表者

野口 明男 (Noguchi, Akio)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：30311971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫に対するテモゾロミド(TMZ)とACNUによるhypermutator(HM)形質発現度及びその分子機序の解析を目的とした。ヒトグリオーマ細胞株U251及びLNZ308、MGMT強制発現株に加え、薬剤を低濃度、長期間暴露し、生存した耐性株を樹立した。親株及び耐性株においてimmunoblot解析で耐性株ではMGMT発現の誘導が認められたが、ミスマッチ修復(MMR)関連タンパク(MSH2, MSH6, MLH1, PMS2)の発現は著変がみられなかった。MLPA法及びがん遺伝子パネル検査でも親株・耐性株に遺伝子変異の変化は検出できず、今回の解析ではTMZとHMの機序解明には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、TMZ及びACNUなどの薬剤による神経膠腫細胞におけるhypermutator形質の発現度や分子機序を解析し、薬剤の種類や腫瘍細胞の背景形質や遺伝子異常のパターンによる相違を明らかにすることで、TMZ治療におけるhypermutator化の危険因子を探索し、TMZ治療の良好な対象群を解明することを目的とした。今回の一連の実験では薬剤耐性獲得とhypermutationの一義的な関連は検証できず、IDH変異の有無を考慮に入れるなど別角度での実験系構築が必要であることが示唆された。本機序が明らかとなれば、神経膠腫治療に新たな指標が導入され、治療向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate molecular mechanisms for developing hypermutation after treatment with temozolomide (TMZ) or ACNU in glioma. Human glioma, MGMT-null cell lines, U251 and LNZ308, MGMT-forced expressing subline were used. TMZ- or ACNU-resistant sublines were also developed by continuous dose-elevating exposure of cells to the drugs. Both TMZ and ACNU resistant cells expressed MGMT whereas their expressions of mismatch repair proteins were not altered. MLPA and Cancer Gene Panel analyses disclosed no additional or new genetic alterations identified in any of resistant sublines. More efforts need to be pursued to clarify the hypermutation phenotype in future studies.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：神経膠腫 遺伝子異常 高度点変異誘導 アルキル化剤 薬剤耐性 個別化治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。抗がん剤抵抗性がその原因のひとつであり、有効な薬剤は限られている。神経膠腫に対する標準治療薬はアルキル化剤であるテモゾロミド (temozolomide; TMZ) であり、最も悪性 (WHO Grade IV) である膠芽腫の主治薬である。その主たる殺腫瘍効果は腫瘍細胞 DNA グアニン残基に O^6 -メチルグアニン (O^6 -MG) を形成することである。 O^6 -MG は、その構造上シトシンとはなくチミンとペアを形成するため、DNA 配列上ミスマッチが生じる。従って、TMZ により O^6 -MG が形成されると、DNA 修復機構であるミスマッチ修復機構 (mismatch repair; MMR) が活性化され、ミスマッチしたチミン残基が除去されるが、 O^6 -MG が残存するため再びチミンが O^6 -MG とペアを形成することとなる。結果 MMR によるミスマッチの修復が繰り返されることとなり、最終的に DNA の二重鎖切断が生じ、細胞死に至る。しかし、 O^6 -MG に対する特異的 DNA 修復酵素の O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) が発現していると、 O^6 -MG は速やかに修復され正常 DNA へ戻るため、TMZ 耐性となる。また、MGMT の発現が乏しい場合でも、MMR 機構の機能低下があると、細胞死は生じにくいいため、 O^6 -MG が残存したまま腫瘍細胞は生存することとなる。 O^6 -MG が残存すると、DNA 複製の際に C:T transition による点突然変異を生じる源泉となることが知られており、TMZ 治療後に生存した腫瘍細胞では、C:T transition を主とした点突然変異が多数生じる可能性が考えられている。米国で実施された膠芽腫における包括的遺伝子解析プロジェクト (The Cancer Genome Atlas; TCGA) の結果、TMZ を主体とするアルキル化剤で治療後の再発腫瘍において、初発時と比較し圧倒的に多数の点変異 (hypermutation) が認められた。さらに、低悪性度神経膠腫 (lower grade glioma; LGG) 特に星細胞腫 (diffuse astrocytoma; DA) から再発し、高悪性度神経膠腫 (high grade glioma; HGG) (主に膠芽腫) へ悪性転化した腫瘍の中に、再発前に TMZ 治療を受け著しい hypermutator 形質を呈する例が多く含まれることが報告された。これらの点変異の中には、腫瘍化に直接影響のあるドライバー遺伝子変異も含まれており、LGG に対する TMZ 治療が逆に悪性を促進する結果をもたらす可能性が指摘された。

このような hypermutator 形成の要因の一つに、MMR の不活化、特に *MSH6* 遺伝子変異が示唆されている。TMZ 以外の主要なアルキル化剤であるニトロソウレア系抗がん剤の ACNU は、TMZ 同様に腫瘍 DNA のグアニン残基の O^6 位をアルキル化するが、TMZ がメチル化するのに対し、ACNU はエチル化を来し、 O^6 -エチルグアニン (O^6 -EG) を形成する。 O^6 -EG は不安定で速やかに DNA の対鎖と架間鎖橋を形成し、DNA 複製の際に致命的傷害をもたらす。従って ACNU は O^6 -MG を形成せず、腫瘍細胞の点変異源とはならないと考えられる。実際、マウスの線維芽細胞を TMZ と ACNU で処理すると、異なる殺細胞経路を辿ることが報告されている。

LGG は星細胞腫と乏突起膠腫 (oligodendroglioma; OD) に大別され、前者では *TP53* 変異が、後者では染色体 1p/19q の共欠失が排他的に生じる特徴がある。本研究開始時までにはアルキル化剤、特に TMZ 治療後に hypermutator 形質を示した報告は DA に限られており、p53 が DNA 傷害の修復・細胞死の判定に強く関与する gate-keeper としての機能をもつことから、DA に特異的な変異である *TP53* 異常が hypermutator 形質の獲得に関与している可能性も考えられていた。

長期生存の期待しうる LGG に対しての治療により、逆に致命的な悪性転化をもたらしうる hypermutator 形質が惹起されることは、神経膠腫治療において極めて重要な高い臨床的意義をもつ問題点と言える。

2. 研究の目的

本研究では、TMZ 及び他のアルキル化剤 (ACNU など) による神経膠腫細胞に対する hypermutator 形質の発生日数、その分子機序を解析し、薬剤の種類や腫瘍細胞の背景形質や遺伝子異常のパターンによる相違を明らかにすることで、TMZ 治療における hypermutator 化の危険因子を探索し、神経膠腫治療の基盤となる TMZ 治療の良好な対象群を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

以下の方法で本研究の実施を計画した。

我々の研究室で保有するヒト・グリオーマ細胞株、TMZ 治療後耐性を獲得した TMZ/ACNU 耐性グリオーマ株、正常ヒト星細胞などを使用する。薬剤の感受性については *in vitro* では MTS アッセイを用いる。TMZ 及び ACNU 等による治療を *in vitro* ならびに *in vivo* (マウス移植腫瘍モデル) で行い、治療後の生存細胞及び再発腫瘍を用いて、その遺伝子異常の変化につき解析を行う。細胞や腫瘍標本からゲノム DNA は QIAGEN DNA mini kit を用いて抽出する。主要な神経膠腫関連のがん遺伝子、がん抑制遺伝子については、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法を用いて解析する。各細胞株における TMZ、ACNU 感受性に関与する遺伝子・因子 (*MGMT*, *MSH1*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2* など) hypermutator に関連しうる遺伝子異常 (*TP53*, *IDH1/2*, *Rad51*, *Chk1/2* など) 神経膠腫における driver mutation などを次世代シーケンサー (NGS) による Cancer Panel 等を用いて検索し、それら遺伝子異常と TMZ 治療後の hypermutation の有無の相関を検討する。TMZ に特異的な hypermutation 関連遺伝子・因子異常が認められれば、その遺

伝子の強制発現または siRNA などによるノックアウトを行い、TMZ 治療後の hypermutator 化を抑制し得るか否かを検証し、最終的には、マウス脳腫瘍モデルにて本現象の検証を行う。

4. 研究成果

- (1) テモゾロミド (TMZ) 及びニムスチン (ACNU) 耐性ヒトグリオーマ細胞株の樹立。

当科研究室で保管しているヒトグリオーマ細胞株の中から、安定した培養が可能で、TMZ および ACNU 耐性の主因子である MGMT が発現していない U251 細胞株及び LNZ308 株を用いた。

TMZ 耐性を示す positive control として、U251 株に MGMT 遺伝子発現ベクターを導入し、MGMT の高発現が確認されている U251.MGMT 株も使用した (Fig. 1)。U251、LNZ308 株に対して、培養液中に IC₅₀ 値以下の濃度で TMZ あるいは ACNU を添加することにより持続曝露状態とした。生存した細胞を bulk として継代培養し、再び TMZ

あるいは ACNU を同濃度、あるいは 1 レベル濃度を上げて培地へ添加した。この作業を繰り返し行うことで、徐々に高濃度の TMZ あるいは ACNU の存在下で増殖可能な bulk サブクローンが樹立した。さらにこれらの bulk 耐性細胞を 10-cm dish に 100 cells のみ希釈して播種し、コロニーを作成したサブクローンを複数確立した。耐性の確認のため、MTS アッセイを行い、U251 株の TMZ 耐性株、ACNU 耐性株でそれぞれ親株の U251 に比較し、TMZ あるいは ACNU への耐性が検証された (Fig. 2)。

- (2) TMZ/ACNU 耐性株における感受性規定因子の発現解析。

TMZ・ACNU 耐性に関与する因子 (MGMT、MMR 蛋白の MSH2、MSH6、MLH1、PMS2) の発現が変化しているか否か、各細胞株、bulk 耐性株、サブクローン株を用いて Western blot 解析にて評価した (Fig. 3)。その結果 TMZ・ACNU 耐性各株において、MGMT の発現誘導が認められた。MGMT の発現レベルは TMZ11 株で最も高く、bulk の U251.TMZ600 では低かった。また ACNU 耐性株でも弱い MGMT 発現が認められた。MMR 蛋白では TMZ600 で PMS2、MLH1 の発現低下の傾向を認めたが、くり返しの実験では一貫せず、明確な耐性獲得と MMR 関連蛋白の発現低下は指摘できなかった (Fig. 3)。

- (3) TMZ 耐性株におけるコピー数変化解析。

U251 及びその耐性株からゲノム DNA を抽出し、MLPA 法を用いて親株および耐性株における主要な遺伝子コピー数変化解析を行った。U251 親株では、CDKN2A 遺伝子、PTEN 遺伝子の部分欠失が認められた。MGMT 強制発現株と TMZ 耐性株ではいずれも同様に CDKN2A 部分欠失、PTEN 部分欠失が認められたが、ACNU 耐性株では CDKN2A 部分欠失のみが認められた (data not shown)。LNZ308 株では、EGFR のコピー数増加と TP53 の欠失が認められた。LNZ308 の TMZ 耐性株の解析は今後実施予定である。

- (4) 次世代シーケンサーによる Cancer Panel 解析。

U251 および薬剤耐性株から抽出したゲノム DNA を用いて、Ion AmpliSeq™ DNA Ready-to-Use Panel にうち、50 のがん遺伝子が搭載されている Cancer Hotspot Panel v2 を使用し、各細胞におけるそれら遺伝子の変異状態を解析した。変異アレル頻度が 40 以上の確実な変異のみを抽出すると、Table 1 に示すように、親株 U251 では、17 箇所 13 遺伝子に主として point mutation が検出された。うち約半数の 8 箇所は synonymous mutation でありアミノ酸の変異は伴わない変異であった。U251 で知られている TP53 の変異は検出された。この変異パターンは、ACNU 耐性株では完全に一致した。一方、TMZ 耐性株では、親株の synonymous EGFR mutation が消失していたが、その他は完全に一致し、TMZ 耐性となることで変異の内容や頻度が亢進するという仮説は検証できなかった。TMZ 耐性株はいずれも完全に同じ

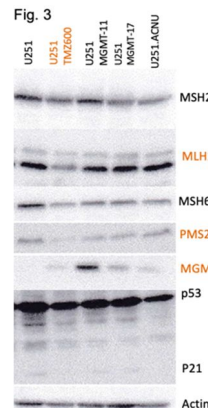
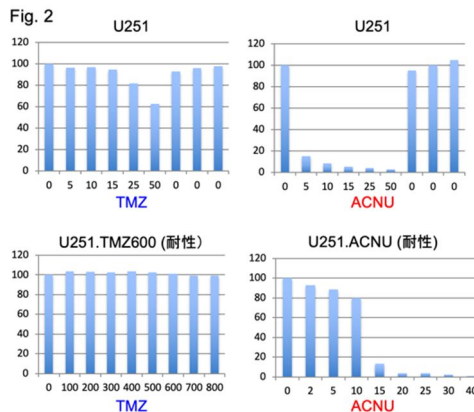


Table 1. Cancer Hotspot Panel v2 analysis for human glioblastoma cell line U251 and its derivatives resistant to TMZ or ACNU

U251		U251.ACNU		U251.TMZ600		U251.TMZ11		U251.TMZ14	
type	gene	function	gene	gene	gene	gene	gene	gene	gene
SNV	ERBB4	synonymous	ERBB4	ERBB4	ERBB4	ERBB4	ERBB4	ERBB4	ERBB4
SNV	ERBB4	unknown	ERBB4	ERBB4	ERBB4	ERBB4	ERBB4	ERBB4	ERBB4
SNV	FGFR3	synonymous	FGFR3	FGFR3	FGFR3	FGFR3	FGFR3	FGFR3	FGFR3
SNV	PDGFRA	synonymous	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA
INDEL	KDR	unknown	KDR	KDR	KDR	KDR	KDR	KDR	KDR
SNV	APC	synonymous	APC	APC	APC	APC	APC	APC	APC
MNV	HMGXB3 CSF1R	unknown unknown	HMGXB3 CSF1R	HMGXB3 CSF1R	HMGXB3 CSF1R	HMGXB3 CSF1R	HMGXB3 CSF1R	HMGXB3 CSF1R	HMGXB3 CSF1R
SNV	EGFR	synonymous	EGFR	EGFR	EGFR	EGFR	EGFR	EGFR	EGFR
SNV	RET	synonymous	RET	RET	RET	RET	RET	RET	RET
SNV	RET	synonymous	RET	RET	RET	RET	RET	RET	RET
INDEL	PTEN	frameshiftinsertion	PTEN	PTEN	PTEN	PTEN	PTEN	PTEN	PTEN
SNV	HRAS	synonymous	HRAS	HRAS	HRAS	HRAS	HRAS	HRAS	HRAS
SNV	FLT3	unknown	FLT3	FLT3	FLT3	FLT3	FLT3	FLT3	FLT3
SNV	TP53	missense	TP53	TP53	TP53	TP53	TP53	TP53	TP53
SNV	TP53	missense	TP53	TP53	TP53	TP53	TP53	TP53	TP53
SNV	STK11	unknown	STK11	STK11	STK11	STK11	STK11	STK11	STK11

Genes with mutational allele frequency ≥ 40 were listed.

変異プロファイルを呈し、アッセイの再現性と耐性株作成過程が安定しているものであったことが明らかとなった。

- (5) 今回の研究結果からは、ヒト・グリオーマ細胞株から TMZ や ACNU 耐性株を樹立することが出来ることを明らかとしたが、その耐性となった主因は既に知られている MGMT の発現誘導である可能性が高く、一定期間内での薬剤暴露のみでは、課題としていた hypermutation が惹起されるための MMR 系の発現低下や変異の獲得に至る割合が低く、更なる予定実験を行うことは出来なかった。

おそらくは、より長期の TMZ 暴露とより多数の耐性サブクローンの採取並びに分子プロファイルの変化についてスクリーニングをすることにより、ごく一部の hypermutator 形質を獲得した細胞を取得することが出来るのではないかと推察される。一方で、hypermutation は臨床的には先行する WHO grade II/III の低悪性度神経膠腫、IDH 変異型の腫瘍に TMZ を長期に投与した際に多く発生する傾向があるため、今回使用した grade IV 膠芽腫の細胞株では hypermutation を惹起することは困難な可能性がある。低悪性度神経膠腫の細胞株は樹立されておらず、別のアプローチによる細胞構築が臨まれる結果とも考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Natsume A, Nagane M, Wakabayashi T, et al.	4. 巻 148
2. 論文標題 Genetic analysis in patients with newly diagnosed glioblastomas treated with interferon-beta plus temozolomide in comparison with temozolomide alone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurooncol	6. 最初と最後の頁 17-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-020-03505-9	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 -

1. 著者名 Iijima S, Saito K, Shimizu S, Kobayashi K, Shimada D, Matsumoto Y, Shiokawa Y, Nagane M	4. 巻 1
2. 論文標題 Clinical and molecular genetic feature of cerebellar glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 ii37-ii38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdz039.170	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Arita H, Nagane M, Ichimura K, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 TERT promoter mutation confers favorable prognosis regardless of 1p/19q status in lower grade gliomas with IDH1/2 mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Com	6. 最初と最後の頁 201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-020-01078-2	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Motoo Nagane, Kuniaki Saito, Keiichi Kobayashi, Saki Shimizu, Nobuyoshi Sasaki, Yuki Yamagishi, Yoshiaki Shiokawa
2. 発表標題 Challenges in optimization of MGMT promoter methylation assays for development of companion diagnosis in glioblastoma
3. 学会等名 24th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永根基雄, 齊藤 邦昭, 小林 啓一, 清水 早紀, 島田 大輔, 松本 淑恵, 佐々木 重嘉, 久米 賢, 飯島 昌平, 山岸 夢希, 塩川 芳昭
2. 発表標題 膠芽腫に対するコンパニオン診断法としてのMGMT遺伝子メチル化の解析法最適化における課題
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第78回 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoo Nagane, Kuniaki Saito, Keiichi Kobayashi, Saki Shimizu, Yoshiaki Shiokawa
2. 発表標題 Mutation change after temozolomide treatment in primary glioblastoma
3. 学会等名 The 15th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagane M, Saito K, Shimizu S, Nozaki E, Kobayashi K, Kume S, Chiba T, Shibahara J, Shiokawa Y
2. 発表標題 Detailed analysis of mutation change after treatment in glioblastoma
3. 学会等名 13th European Association of Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoo Nagane, Yusuke Tabei, Keiichi Kobayashi, Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Yoshiaki Shiokawa
2. 発表標題 IDH gene mutation status plays no impact on survival in patients with glioblastoma at a first progression
3. 学会等名 22nd International Conference on Brain Tumor Research and Therapy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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	永根 基雄 (Nagane Motoo) (60327468)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	

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