

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591589
 研究課題名（和文） DNA修復酵素－メチルグアニンメチル基転移酵素をターゲットとした膵癌分子標的治療
 研究課題名（英文） Role of DNA repair enzyme in the resistance of pancreatic cancer

研究代表者
 上野富雄（UENO TOMIO）
 山口大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：70284255

研究成果の概要：

膵癌は腫瘍内の DNA 修復酵素であるメチルグアニンメチル基転移酵素（MGMT）活性が高値であるためメチル化剤に対して耐性を示すとされている。O⁶-benzylguanine（O⁶-BG）MGMT を抑制する分子標的治療薬であり、これを用いて膵癌腫瘍細胞内の MGMT を不活化し、新規メチル化抗癌剤である temozolomide（TMZ）と組み合わせた、膵癌の生物学的特性を逆にターゲットとしたに対する新たな分子標的治療を確立する目的で本研究を行った。その結果、本療法の有用性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学

1. 研究開始当初の背景

Temozolomide（TMZ）は新規に開発されたメチル化剤であり、米国において神経芽細胞腫、メラノーマに対して臨床研究が進んでおり、その有用性は N Engl J Med にも報告されている。TMZ は DNA の O⁶-guanine をメチル化し、抗腫瘍活性を示すが、DNA 修復酵素であるメチルグアニンメチル基転移酵素（O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase: MGMT）により不活化される。すなわち、腫瘍細胞内 MGMT 活性の上昇は TMZ に対し

て耐性を有することを意味し、MGMT の抑制により TMZ の抗腫瘍効果は増強する。一方、膵癌は腫瘍内の MGMT 活性が高値であるため、メチル化剤に対して耐性を示すとされ、ほとんど臨床で使用されることはない。O⁶-benzylguanine（O⁶-BG）は MGMT 活性を選択的に一時的に不活性化させる分子標的治療薬として注目されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は分子標的治療薬である O⁶BG

にて膵癌腫瘍細胞内 MGMT を不活化し、新規メチル化抗癌剤である TMZ と組み合わせ、膵癌の生物学的特性をターゲットとした膵癌に対する新たな有効な分子標的治療の戦略を展開することにある。

3. 研究の方法

(1) 移植細胞の検討

細胞内の DNA 修復酵素であるメチルグアニンメチル基転移酵素 (MGMT) をコードしている *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は MGMT 活性を低下させるため、実験動物に移入する膵癌細胞株の *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の同定は、本分子標的治療を評価する上において重要な意味をもつ。そのため教室で保有し、動物実験に使用可能な膵癌細胞株 (YPK-1、YPK-2、YPK-3、YPK-4、YPK-5、YPK-6、YPK-8、YPK-9、YPK-10) の *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の有無とその程度について検討した。それぞれの細胞株を培養し、genomic DNA を抽出し、Bis 処理を行った後、methylation specific PCR を施行した。いずれも triplicate で行った。

(2) 分子標的治療薬およびメチル化剤の至適投与量の検討

以前報告したヌードラットの検討をもとに、O⁶BG は 0.35 mg/kg、1.75 mg/kg、3.5 mg/kg、7 mg/kg の腹腔内投与を行い至適投与量の検討を行った。TMZ は 150 mg/kg、350 mg/kg、500 mg/kg、750 mg/kg、1500 mg/kg の腹腔内投与を行い至適投与量の検討を行った。

(3) ヌードマウスにおける移入膵癌細胞に対する本治療の効果

実験(1)で選択された膵癌細胞株を 5×10^6 個に調整しヌードマウスの腹壁に移入した。移植腫瘍の最大長径が 1 cm を越えた段階で①～④群に割り付けを行った。実験(2)の結果を踏まえ、O⁶BG は 3.5mg/kg、TMZ は 750mg/kg の腹腔内投与を行なった。

①無治療群

40% polyethylene glycol-400 (PEG) を腹腔内投与し、2時間後に TMZ の溶媒である 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む phosphate buffered saline (PBS) 腹腔内投与する。

②O⁶BG 単独投与群

3.5 mg/kg の O⁶BG を腹腔内投与し、2時間後に 10% DMSO を含む PBS のみを腹腔内投与する。

③TMZ 単独投与群

O⁶BG の溶媒である 40% PEG を含む PBS のみを腹腔内投与し、2時間後に 750mg/kg の TMZ を腹腔内投与する。

④O⁶BG および TMZ 投与群

3.5 mg/kg の O⁶BG を腹腔内投与し、2時間後に 750mg/kg の TMZ を腹腔内投与する。

4. 研究成果

(1) 移植細胞の検討

YPK-1、YPK-2、YPK-3、YPK-4、YPK-5、YPK-6、YPK-8、YPK-9、YPK-10 をそれぞれ培養し、genomic DNA を抽出し、methylation specific PCR を施行し、*MGMT* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の有無ならびにその程度について検討を行った結果を示す (図 1～3)。



図 1

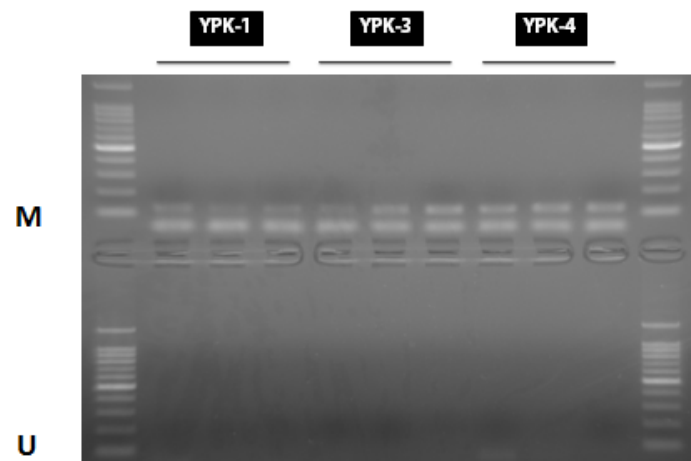


図 2

図1および2上段は *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域がメチル化されているときにバンドが検出されるプライマー (M) を、下段は非メチル化されているときにバンドが検出されるプライマー (U) を用いている。図1の YPK-2 は M-U+, YPK-5 は M-U+と判定されるが、YPK-1、YPK-3、YPK-4 についてはいずれもバンドの検出が不明瞭であったため、PCR のアニーリングの温度を下げ、再度検討したところ、いずれも M+U-と判定でき *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域がメチル化されていることが判明した (図2)

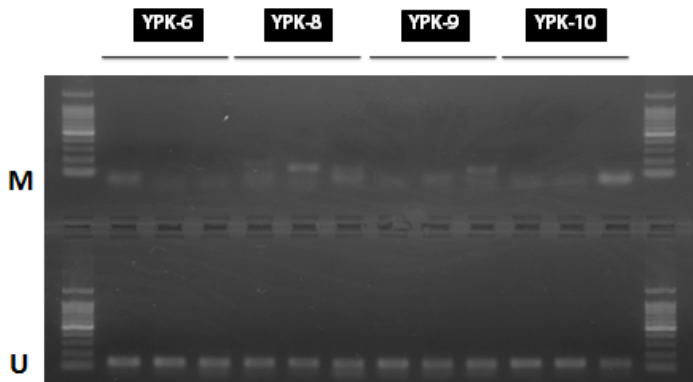


図3

図3の YPK-6、YPK-8、YPK-9、 YPK-10 の検討では、いずれも M-U+と判定でき、*MGMT* 遺伝子のプロモーター領域が非メチル化されていることが判明した。

以上の結果から、YPK-1、YPK-3、 YPK-4 は *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域がメチル化されており、YPK-2、YPK-5、YPK-6、YPK-8、YPK-9、 YPK-10 がいずれも *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域はメチル化を受けていないことが判明した。そこで、YPK-2、YPK-5、YPK-6、YPK-8、YPK-9、 YPK-10 をヌードマウスの腹壁に移入したところ、生着率のよい最もよかった YPK-10 を実験(3)における至適細胞と判断した。

(2) 分子標的治療薬およびメチル化剤の至適投与量の検討

ヌードラットの検討から O⁶BG は 0.35 mg/kg、1.75 mg/kg、3.5 mg/kg、7 mg/kg の腹腔内投与を行い至適投与量の検討を行った。TMZ は 150 mg/kg、350 mg/kg 500

mg/kg、750 mg/kg、1500 mg/kg の腹腔内投与を行い至適投与量の検討を行った。その結果、O⁶BG は 3.5mg/kg、TMZ は 750mg/kg の腹腔内投与がヌードマウスに対して、毒性なく至適投与量と判断した。

(3) ヌードマウスにおける移入腫瘍細胞に対する本治療の効果

実験(1)で得られた結果をもとに、YPK-10 を 5×10^6 個に調整し、P ヌードマウスの腹壁に移入し、移植腫瘍の最大長径が 1 cm を越えた段階で4群に割り付け、それぞれの治療効果を検討した。図4に結果を示す。

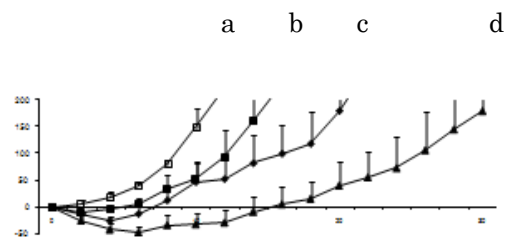


図4

a が無治療群、b が O⁶BG 単独投与群、c が TMZ 単独投与群、d が O⁶BG および TMZ 投与群である。

3.5 mg/kg の O⁶BG を腹腔内投与し 2 時間後に 750mg/kg の TMZ を腹腔内投与した群(d) に有意な腫瘍縮小効果と生存率の向上を認めた。

メチル化剤に対して耐性を示す腫瘍細胞移植腫瘍において、分子標的薬である O⁶BG で腫瘍内 *MGMT* 活性を抑制することで、抗腫瘍活性の増強を認めたことから、生物学的特性を逆にターゲットとした本療法の有用性が示唆されたといえる。

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)

(1) Hiroshi Kondo, Shoichi Hazama, Toru Kawaoka, Shigefumi Yoshino, Shin Yoshida, Kazuhisa Tokuno, Motonari Takashima, Tomio Ueno, Yuji Hinoda, Masaaki Oka. Adoptive immunotherapy for pancreatic

cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes
Anticancer Research Vol.28 (1B) 379-388, 2008

(2) Toru Kawaoka, Masaaki Oka, Motonari Takashima, Tomio Ueno, Koutaro Yamamoto, Noboru Yahara, Shigefumi Yoshino, Shoichi Hazama

Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer: Cytotoxic T lymphocytes stimulated by the MUC1-expressing human pancreatic cancer cell line YPK-1
Oncology Report Vol.20 (1) 155-163, 2008

〔学会発表〕 (計1件)

(1) 吉田 晋、裕 彰一、得能和久、飯田通久、鈴木伸明、高島元成、上野富雄、岡 正朗

膵癌に対する MUC1-CTL を用いた術後補助細胞療法

第63回日本消化器外科学会総会 2008.7.17 (札幌)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 富雄 (UENO TOMIO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70284255

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし