

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19591706  
 研究課題名（和文）神経膠腫における MGMT 遺伝子の SNP 解析とその生物学的・臨床的意義の  
 検証  
 研究課題名（英文）Biological and clinical relevances of SNP of MGMT gene in diffuse  
 gliomas  
 研究代表者  
 渡邊 学郎（WATANABE TAKAO）  
 日本大学・医学部・准教授  
 研究者番号：40287652

研究成果の概要：神経膠腫患者の培養細胞株および臨床検体において MGMT 遺伝子の SNP を解析したところ、24%に codon 84 の SNP が認められたが、その存在は遺伝子発現や治療感受性とは関連せず、生物学的・臨床的意義を見出すことはできなかった。そこで、MGMT 遺伝子の発現を制御するメチル化について検討した。Methylation-specific PCR (MSP) MSP 法によるメチル化解析結果は、false-negative であった 1 例の手術検体を除き、すべて golden standard である bisulfite sequence 法の結果と一致した。また、glioma 細胞株においては、MGMT 蛋白発現が消失している細胞株はいずれもメチル化陽性であった。以上、MSP による MGMT メチル化解析はルチーンに臨床応用するうえで有用かつ信憑性の高い方法である。この研究結果は 2008 年の Int J Oncol に掲載されている。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：脳神経外科学

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：神経膠腫、MGMT、SNP、メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

外胚葉神経上皮より由来する神経膠腫は、浸潤性格を有する脳実質内腫瘍であり、その手術摘出は神経機能温存のために制限を受け、治療成績は依然として満足すべきもので

はない。特に最も頻度の高い膠芽腫は、放射線治療および化学療法に強い抵抗性を示し、きわめて治療に難渋する悪性腫瘍である。近年の分子生物学の飛躍的な進歩により、神経膠腫の発生、増殖、浸潤に関わる数々の遺伝

子変異が同定されつつある。現在のところ、これらの分子生物学的研究の成果が直接日常の診療に役立つには至っていないが、**O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)** の不活性化と化学療法感受性との有意な関係は臨床的に最も意義ある知見の一つと言える。**MGMT**はニトロソウレアをはじめとしたアルキル化剤により形成された**O<sup>6</sup>-アルキルグアニン**を特異的に修復する**DNA修復酵素**であり、その活性化はアルキル化剤耐性の主因と考えられている。**MGMT**の発現は主に機序は主にその遺伝子の転写調節 (プロモーター) 領域のメチル化によって制御されており、高メチル化による**MGMT**の不活性化はアルキル化剤に対する感受性を高めることが証明されている。しかしながら、**MGMT**の発現が消失している症例のすべてが高メチル化を有するわけではなく、**MGMT**の発現制御にはメチル化以外の機序が関与していると推察される。

近年、疾患遺伝子のポジショナルクローニングにて脚光をあびているのが、**single nucleotide polymorphism (SNP)** である。**SNP**とは多型性 (**polymorphism**) の一つで、1塩基が異なっているものをいう。**SNP**は遺伝子の変異には直接結びつかないものの、遺伝子発現の差異に反映するものが少なからず存在し、それが疾患の遺伝的リスクファクターと関連する可能性が示唆されている。**MGMT** 遺伝子においても、いくつかの**SNP**が数々の癌腫にて検出されており、遺伝子発現や治療感受性との関連が報告されつつあるが、神経膠腫に関してはほとんど検討されていない。特に神経膠腫の細胞生物学的特性との関連についてはまったく解明されていない。本研究の課題は、神経膠腫における**MGMT** 遺伝子の**SNP**を解析し、治療反応性を含めた生物学的特性との関連とそれに関

わる分子機構を解明することにより、化学療法感受性を予測し得るマーカーとして臨床へトランスレーションすることにある。

これまでの研究実施状況としては、“我々は種々の神経膠腫における**MGMT**のメチル化を**methylation-specific PCR**にて検討してきた。当施設にて治療された悪性神経膠腫患者においては、**MGMT**のメチル化の存在は良好な化学療法感受性と生存期間の延長とに有意に関係することが示された (**Watanabe et al, Int J Cancer 113:581-587, 2005**)。これらの結果は、**MGMT**のメチル化陽性腫瘍に対して**ACNU**を中心としたアルキル化剤を選択的に投与するテーラーメイド化学療法の有用性を示唆するものであり、2002年より、我々は悪性神経膠腫に対して**MGMT**のメチル化解析に基づくテーラーメイド化学療法を行っている。最初の20例については、今年の**Neurol Med Chir**に報告しているが、その治療成績は依然として満足すべきものではない (**Watanabe et al, Neurol Med Chir 46:389-396, 2006**)。本研究課題は我々の個別化治療を進展させるものであり、**MGMT**の**SNP**を抗癌剤の選択基準としてのマーカーとして利用できれば、より細分化・個別化されたテーラーメイド化学療法が展開されるものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の意義は、**MGMT** 遺伝子の**SNP**と神経膠腫の生物学的特性との関連性を明らかにすることにより、個々の症例に応じて抗癌剤を選択する個別化化学療法のシステム構築に寄与することである。**MGMT**の**SNP**とアルキル化剤感受性との関連性が見出されれば、抗癌剤の選択基準としての分子マーカーの確立につながると考えられる。既存の抗癌剤を効果的に選択するテーラーメイド化学療法は即応した治療戦略であり、奏効率

の向上と副作用の軽減に寄与し、悪性神経膠腫に苦しむ患者に光明をもたらすものと期待される。

### 3. 研究の方法

神経膠腫患者の臨床検体において *MGMT* 遺伝子の *SNP* を解析し、組織型、悪性度、治療感受性、生命予後、および我々がこれまでに解析してきた様々な遺伝子異常との関係を検証する。

*MGMT* 遺伝子の *SNP* としては、5 つの *codon* の *polymorphism* を検索する。神経膠腫では文献的に *codon 84* の *polymorphism* が検討されてきたが、本研究では、様々な癌腫にて検出されている *codon 53*、*143*、*178*、および *197* の *polymorphism* についても検索する。*SNP* の解析方法としては、*SSCP-PCR*、リアルタイム定量 *PCR*、および *DNA* チップがあるが、当施設にはすでにリアルタイム定量 *PCR* が設置されているので、これを利用して *SNP* 解析を行う。

対象は、成人大脳半球の初発神経膠腫である。神経膠腫には様々な種類があるが、統計学的に意義ある結果を引き出すためにはある程度の症例数が必要なこととから、本研究では成人大脳半球に発生する星細胞系腫瘍と乏突起膠細胞系腫瘍の初発症例に限定する。内訳は、びまん性星細胞腫 (*WHO* 分類グレード 2) 32 例、退形成性星細胞腫 (グレード 3) 38 例、および膠芽腫 (グレード 4) 72 例の計 142 例の星細胞系腫瘍と、乏突起膠腫 (グレード 2) 11 例および退形成性乏突起膠細胞系腫瘍 (グレード 3) 18 例の計 29 例の乏突起膠細胞系腫瘍である (総計 171 例)。

検出された各種 *SNP* と、組織型、悪性度、臨床経過、およびその他の遺伝子異常との関係を統計学的に検討する。組織型は星細胞系腫瘍と乏突起膠細胞系腫瘍、悪性度は *WHO* 分類のグレードにて評価する。臨床経過に関

しては、退形成性星細胞腫 38 例と膠芽腫 72 例の計 110 例は画一された治療プロトコルにてプロスペクティブに治療されており、臨床的意義を検証するのに十分なパワーがあると考えられるので、この 110 例においては、補助療法に対する腫瘍縮小効果、非増悪生存期間、および全生存期間をエンドポイントとして評価する。腫瘍縮小効果については、いずれの症例も術後 72 時間以内の早期とその後定時的に造影 *MRI* が行われており、治療効果を正確に判定することが可能である。また、その他の遺伝子異常としては、これまでに我々が検索してきた *TP53* 遺伝子変異、第 10 染色体欠失、*p14<sup>ARF</sup>* 遺伝子の両アリル欠失と高メチル化、*p15<sup>INK4b</sup>* 遺伝子の両アリル欠失と高メチル化、*p16<sup>INK4a</sup>* 遺伝子の両アリル欠失と高メチル化、*p73* 遺伝子の高メチル化、*MGMT* 遺伝子の高メチル化などについて検討する。

また、神経膠腫細胞株において、*SNP* の有無が *MGMT* の発現やアルキル化剤の抗腫瘍効果に関係するか否かを検証する。神経膠腫細胞株としては *A172*、*U87MG*、*U251MG*、*T98G*、*YH13*、*AM38*、および *U138MG* を用いる。いずれの細胞株も、すでに当施設にて購入・継代培養しているものであり、これまでに数々の遺伝子変異やその発現制御について検討してきている。抗癌剤としては *ACNU* と *temozolomide* を用いる。悪性神経膠腫において、大規模な臨床試験にて評価された抗腫瘍薬は *ACNU* などのニトロソウレア系薬剤のみであったが、2005 年の *N Engl J Med* に報告された臨床研究では、第 2 世代のアルキル化剤である *temozolomide* の膠芽腫に対する有効性が最もエビデンスレベルの高い第 III 相試験にて証明されている。本剤の耐性機構には、ニトロソウレア系薬剤と同様、*MGMT* が重要な役割を果たしていると考え

られている。今後の悪性神経膠腫に対する治療はtemozolomideを中心とした多剤併用化学療法が展開されていくものと推察されるので、本研究ではこのtemozolomideについても検討することにする。各種細胞株を48-72時間培養した後、DMA、RNA、および蛋白を抽出し、それぞれについて、リアルタイム定量PCRによるMGMTのSNP解析、リアルタイム定量PCRによるMGMT mRNAの発現解析、ウェスタン・ブロッティングによるMGMT蛋白の発現解析を行う。各種抗癌剤感受性については、MMT assayから算出したIC<sub>50</sub>にて評価する。

#### 4. 研究成果

結果として、codon 84のpolymorphismが20%に検出されたが、組織型(星細胞系腫瘍VS乏突起膠細胞系腫瘍)、悪性度(WHO分類のグレード)、臨床経過(画一された治療プロトコールにてプロスペクティブに治療された退形成性星細胞腫38例と膠芽腫72例の計110例における補助療法に対する腫瘍縮小効果、非増悪無生存期間、および全生存期間)、およびその他の遺伝子異常(TP53遺伝子変異、第10染色体欠失、p14<sup>ARF</sup>遺伝子の両アリル欠失と高メチル化、p15<sup>INK4b</sup>遺伝子の両アリル欠失と高メチル化、p16<sup>INK4a</sup>遺伝子の両アリル欠失と高メチル化、p73遺伝子の高メチル化、MGMT遺伝子の高メチル化)とに有意な関係は認められなかった。

そこで、MGMT遺伝子の発現を制御するメチル化について、25例glioblastoma手術検体と7つのglioma細胞株(A-172、AM-38、T98G、U-87MG、U-138MG、U-251MG、及びYH-13)にて検討した。

MGMT遺伝子のメチル化については、methylation-specific PCR (MSP)法にて検索し、その結果をbisulfite sequence法にて比較検討した。Bisulfite sequence法では、

MGMT遺伝子プロモーター内の27個のCpG siteの塩基配列を検索した。5'上流側よりCpG siteに1から順に27まで番号を振った場合、MSP法でのprimerはforwardで5~9、reverseで13~16に相当した。またこの方法において、27個のCpG siteのうち50%以上がメチル化している場合、メチル化陽性と判断した。また、thymineのピークがcytosineの同等かもしくは50%以上の場合はpartial methylationと定義した。MGMT蛋白の発現を調べるために、臨床症例では免疫組織化学染色、glioma細胞株ではwestern blotting法にて検討した。

MSP法によるメチル化解析では、7つのglioma細胞株のうち5つの細胞株でメチル化陽性であった。そのうち、A-172、AM-38、U-87MGはmethylatedのみにバンドが見られ、T98GとU-251MGはmethylatedおよびunmethylatedの両方にバンドが見られた。YH-13、U-138MGはunmethylatedのみにバンドが見られた。これらglioma培養細胞におけるMGMT発現をwestern blotting法にて調べたところ、MSP法でmethylatedのみにバンドが見られたA-172、U-87MG、AM-38ではMGMT蛋白は検出されず、MSP法にてunmethylatedのみにバンドが出現したU-138MGとYH-13ではMGMT蛋白発現が認められた。一方、methylatedおよびunmethylatedの両方のバンドが検出された細胞株においては、T98GではMGMT蛋白の発現が認められたのに対し、U-251MGでは発現していなかった。MSP法でmethylatedのバンドが検出された場合、bisulfite sequence法で検索し得たCpG siteのうち50%以上がメチル化していた。

臨床症例においては、合計25例で検討した。MSP法においては25例中8例(32%)でmethylatedにバンドが検出された。そのうち

21例で bisulfite sequence 法によるメチル化解析を行った。MSP 法でメチル化陽性と判断した症例では CpG site のうち 88.5%がメチル化しており、MSP 法にてメチル化陰性と判断した症例ではわずか 5.8%にのみメチル化を認めるにすぎなかった。この MSP 法では false-negative であった 1例を除き、それ以外の症例では MSP 法と bisulfite sequence 法の結果は合致していた ( $p = 0.0003$ )。MSP 法と免疫染色での陽性細胞数の割合、および bisulfite sequence 法と免疫染色の結果の間では (cut off 値 10, 20, 30, 35%) いずれも相関関係は認められなかった。

Glioblastoma において MGMT プロモーター領域のメチル化は、化学療法感受性を決定する重要な因子の1つであり、この重要な biomarker を臨床応用するためには簡便かつ信頼のおける検索方法が求められる。多くの施設において MSP 法が行われているが、その信憑性に疑問を呈する報告もある。我々は glioblastoma 25症例と7つの培養細胞株を用いて MGMT プロモーター領域のメチル化を MSP 法および bisulfite sequence 法で比較検討した結果、1例を除きすべて合致した。この結果により MSP 法は臨床で使用される MGMT メチル化解析として、充分信頼できる方法であると考えられる。しかし、その一方でわずかではあるが我々の症例と同様、両者の解析法による結果が一致しない例が報告されている。その原因として、腫瘍内に僅かにメチル化している細胞が存在する場合、MSP 法でメチル化陽性と判断されている可能性がある。その他の要因として壊死組織の混入、bisulfite 処理による DNA への影響、PCR の条件などが考えられる。その対策として病理標本との比較、検体の採取場所を複数にする、PCR の条件を変更するなどを行う必要がある。また DNA の量と質を評価するた

めに、MGMT メチル化の症例においても internal amplification control として MSP 法で unmethylated にバンドが検出されることを常に確認することも重要である。我々の症例において、MSP 法で unmethylated のみにバンドが検出されたにもかかわらず、bisulfite sequence 法でメチル化していると判断された症例においては、以前 MSP 法を施行するため採取した際に、壊死組織の混入があった可能性があり、MSP 法でメチル化陰性と判断された可能性がある。

免疫染色は MGMT 蛋白発現を確認する最も一般的で簡便な方法であるが、その評価は観察した個々の判断にゆだねられるため、その評価法には客観性に欠ける問題がある。また MGMT メチル化と免疫染色の関係については、関連するとする報告から、関連しないとする報告もあり、未だ議論の分かれるところである。さらに MGMT 蛋白の発現はステロイド、放射線、遺伝子異常を引き起こしうる薬剤、p53 などの様々な因子の影響を受けることから、その判断には慎重でなければならない。

また、現在 EORTC では、temozolomide の維持療法において、従来通りの 1 week on / 3 weeks off と、増量した 3 weeks on / 1 week off の trial が行われている。この trial では MGMT のメチル化は MSP 法にて判定している。MGMT メチル化の有無で振り分けを行ってはいないが、MGMT メチル化陰性症例でも、あえて temozolomide を増量することで MGMT の枯渇化を図りその治療効果が得られるか否か結果が待たれるところである。こうしたことから MGMT メチル化の判定は、temozolomide が第一選択となった現在でも重要であると考えられる。MGMT メチル化の判定方法として、MSP 法は簡便かつ安易で信憑性があり、MGMT メチル化の判定方法とし

て、今後も有用であると考えられる。

## 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 1 件)

1. Yachi K, Watanabe T, Ohta T, Fukushima T, Yoshino A, Ogino A, Katayama Y, Nagase H: Relevance of MSP assay for the detection of *MGMT* promoter hypermethylation in glioblastomas. Int J Oncol 33:469-475, 2008

[学会発表] (計 3 件)

1. 渡邊学郎, 谷地一成, 太田隆, 福島崇夫, 吉野篤緒, 片山容一, 永瀬浩喜: Glioblastomaにおける*MGMT*遺伝子のメチル化解析の意義. 第26回日本脳腫瘍学会, 松山, 2008年11月
2. Yachi K, Watanabe T, Ohta T, Fukushima T, Yoshino A, Ogino A, Katayama Y, Nagase H: Relevance of MSP assay for the detection of *MGMT* promoter hypermethylation in glioblastomas. The 8<sup>th</sup> Meeting of the European Association of NeuroOncology, Barcelona, Spain, September 2008.
3. 谷地一成, 太田隆, 荻野暁義, 福島崇夫, 渡邊学郎, 吉野篤緒, 片山容一: Glioblastomaにおける*MGMT*遺伝子メチル化の意義: 個別化化学療法におけるMSPの信憑性の検証. 第67回日本脳神経外科学会総会, 盛岡, 2008年10月

[図書] (計 1 件)

1. 渡邊学郎: 脳腫瘍の分子診断と薬剤感受性. 癌の基礎から臨床へ: ベンチからベッドサイドへ (西條長宏監修, 牛島利和・後藤典子・西尾和人編集) pp67-75, 篠原出版新社, 2008.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 学郎 (WATANABE TAKAO)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 40287652

(2) 研究分担者

福島 崇夫 (HUKUSHIMA TAKAO)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 20350019

吉野 篤緒 (YOSHINO ATSUO)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 50256848

片山 容一 (KATAYAMA YOICHI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 00125048

(3) 連携研究者

なし