

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20390391

研究課題名(和文)

悪性神経膠腫に対する temozolomide 化学療法の増感法開発のための基礎研究

研究課題名(英文)

Chemosensitization of human glioma cell to chemotherapeutic agent temozolomide

研究代表者

廣瀬 雄一 (HIROSE YUICHI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：60218849

研究成果の概要(和文)：ヒトグリオーマ細胞株 U87MG を使い、化学療法剤 temozolomide (TMZ)によって惹起される細胞内反応を解析し、特に G2 チェックポイント機構の活性化と DNA 修復機構との関係を調べながら、同剤による化学療法増感法の開発の可能性を探った。

研究成果の概要(英文)：Using human glioma cell line U87MG, biological responses of glioma cells to chemotherapeutic agent temozolomide (TMZ) was investigated. Especially, linkage between G2 checkpoint activation and DNA repair mechanism was thoroughly investigated in order to develop novel TMZ-related therapeutic regime against chemotherapy-refractory gliomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

研究分野：医歯薬学

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：悪性神経膠腫、temozolomide、G2 チェックポイント、cancer stem cell

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫(グリオーマ)の外科的手術による根治は困難であり、その治療の上で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。近年、経口投与可能な新世代 DNA メチル化剤 temozolomide (TMZ)がグリオーマ治療に導入されて好成績を挙げ、今後同剤が悪性神経膠腫に対する化学療法において中心的薬剤になることが予想される。しかし同剤を用いても最も悪性度の高い膠芽腫の平均生存期間は数ヶ月延長したのみであり、現状では同腫瘍の

根治に向けた有効な化学療法が確立しているとは言えない。このことは *in vitro* での実験結果に基づいたグリオーマ細胞の各種化学療法剤に対する生物学的反応に関して知見が不足している事も一因であると考えられる。1998年の Cairncross らの報告以来、第1染色体 p 腕と第19染色体 q 腕に DNA コピー数減少がある退形成乏突起神経膠腫は化学療法感受性が良好であることが様々な研究グループから報告され、悪性グリオーマの治療に大きな貢献をしているが、何故そのような遺伝学的異常を持った腫瘍が

化学療法剤に良好な反応を示すのかについては、その生物学的な機序は解明されておらず、ほとんどの知見は臨床経験に基づいたものであるため、さらに有効・安全な化学療法の開発の可能性は十分検討されていない。近年は TMZ を含む DNA アルキル化剤による DNA 損傷を修復する酵素 O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) とグリオーマの薬剤感受性との関係が注目されており、この酵素の不活化により治療効果を向上させようとする試みもなされているが、臨床例において MGMT が高発現を示すことは多くなく、また MGMT 以外の要素(例: DNA ミスマッチ修復系の変異)による薬剤耐性の機序も示唆されており、更なる細胞生物学的な知見の蓄積が必要である。

現在まで、他臓器の腫瘍と比べて、悪性グリオーマに対する化学療法に関係した基礎実験的な検討は少なく、化学療法剤処理を受けたグリオーマ細胞において如何なる細胞生物学的反応が起きているかを解析することは今後の新治療法開発に向けて有意義な情報を提供しうるものと考えられる。本研究では様々な化学療法に関して作用増強法の可能性を探るが、今後グリオーマに対する化学療法の中心的薬剤になる可能性のある TMZ に関する検討を重点的に行うことで、より臨床応用の可能性の高い研究知見を得られるものと考えられた。近年の convection-enhanced drug delivery 法などの脳内局所薬剤投与法の開発もあり、全身的合併症を避けながら化学療法剤の増感を図ることは理論的に可能であるため、本研究から得られる知見はいわゆる translational research としての有用性もあるものと考えられた。また cancer stem cell を用いた解析からは、未解明な点の多い同細胞の生物学的特性についての知見も得られ、確立培養グリオーマ細胞を用いた研究から得られた知見を臨床応用上でどのような戦略を考察すべきかについての有用な情報が得られると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、ヒトグリオーマ細胞が TMZ 処理に反応して G2 期細胞周期停止を起こす事を報告しているが、DNA 損傷を受けた細胞が細胞周期進行を制御して DNA 修復を図る所謂 DNA チェックポイント機構と、細胞の化学療法剤に対する感受性との関係を示唆する報告があり、化学療法剤によって生じた DNA 損傷を腫瘍細胞が如何にして修復するかは重要な研究課題とされている。即ちこの機構を解明することによりグリオーマの化学療法耐性獲得機構の

解明につながる知見を得られる可能性がある。正常細胞においては G1 期を含む各細胞周期においてチェックポイントが機能しているため DNA 損傷に反応して G1 期細胞周期停止をきたすことが予想され、実際、in vitro の研究でもこの考えを支持する知見が得られているが、悪性グリオーマでは G1 期に細胞周期を停止する G1 チェックポイント機構に機能異常を認める事が多い(例: p53 の変異、p16 の発現低下)。したがって G2 チェックポイント機構の重要性が大きいと考えられ、G2 チェックポイント機構の解析がグリオーマに対する化学療法増感法開発につながる可能性もある。実際に我々は G2 チェックポイント系の上流において重要な役割を果たす蛋白である Chk1 キナーゼや p38 キナーゼを阻害する事によってヒトグリオーマ細胞の TMZ に対する感受性を増強することが可能であるという知見を得ているが、このことは G2 チェックポイント機構が化学療法増感法開発のための標的として有力であることを示唆している。この仮説は更に検討を重ねる意義があると考えられるが、我々は更に、予備実験から、G2 チェックポイント機構を阻害すると TMZ 耐性細胞株ですら再感受性化させることが可能であることを確認しており、G2 チェックポイント機構が細胞周期調節のみならず細胞保護作用にも関わっていることを示唆する知見を得ている。一方、Akt をはじめとした細胞死抑制因子の腫瘍治療上の重要性が注目されており、元来、低酸素状態や遺伝的不安定性といった細胞ストレスとなり得る状況下で生存する腫瘍細胞における細胞死抑制因子の生物学的意義は大きく、これらの因子の修飾は悪性グリオーマにおける化学療法の効果を増強する可能性がある。しかも近年の研究から、細胞死抑制因子の抑制は、これらを高発現している腫瘍細胞において正常細胞におけるよりも大きな影響を持つ可能性が高いため、正常組織を保護しながら腫瘍の治療にあたる臨床医療へと応用できることも予想される。

本研究では、悪性グリオーマにおける化学療法増感法開発の可能性を探ることを大きな目的とし、以下の点に注目して解析を行った。

- (1) 培養ヒトグリオーマ細胞における各種化学療法剤による G2 期細胞周期停止機構に焦点を当て、特に G2 チェックポイント機構の下流因子の細胞周期制御以外の機能についての解析を行う。特に cdc2 キナーゼ(G2 期細胞周期停止の key protein)の機能に注目し、このキナーゼの修飾により化学療法剤の作用を増強できるか検討する。

- (2) 抗細胞死因子である Akt キナーゼは受容体型チロシンキナーゼからの情報が phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) を介して伝達される事で活性化するが、PTEN ホスファターゼにより負の制御(活性抑制)を受ける。これまでの遺伝学的検討により得られた知見より、悪性グリオーマにおいては PTEN の不活化が多く認められ、特に腫瘍が退形成星細胞腫(grade 3)から膠芽腫(grade 4)に進行する時に特徴的に起きる異常であるとされており、一般的に grade 4 腫瘍は grade 3 腫瘍より化学療法抵抗性である。我々は Akt キナーゼ系の活性亢進によりヒトグリオーマ細胞における TMZ 処理後の G2 期細胞周期停止機構が抑制される事を報告したが、Akt が G2 チェックポイントを抑制しながら DNA 損傷後の細胞生存を促進することを解明しており、グリオーマの薬剤耐性を克服する治療法を開発するためには Akt キナーゼによる細胞死抑制機序(下流因子の同定)とともに同キナーゼによる細胞周期停止機構からの逸脱機序の解明も重要な課題となる。我々は Akt キナーゼを外因性に活性調節可能な形で導入したグリオーマ細胞を作製しているが、これを用いて G2 チェックポイント機構と Akt 系の関係を解析しながら、Akt 系の活性が亢進している悪性グリオーマにおける化学療法増感法開発の可能性を探ることが可能であると考えられる。
- (3) これらの検討と平行して化学療法剤による処理を低濃度から徐々に高濃度にかけていく dose escalation により化学療法剤耐性グリオーマ細胞株を作成し、前述の知見を応用して化学療法耐性を克服する方法を検討し、将来臨床応用可能な形でのグリオーマ化学療法増感法の開発のための契機を得ることを目的とした研究を行う。
- (4) 一方、近年 cancer stem cell の概念が導入され、これらの細胞が化学療法や放射線療法に対して抵抗性を持ち、かつ新たな腫瘍形成に参加することが示唆されている。我々は外科的に切除した悪性グリオーマ組織より分離した cancer stem cell が分離元の腫瘍組織と同じ遺伝学的特性を持つことを comparative genomic hybridization (CGH) 法により確認している(未発表データ)。確立した培養グリオーマ細胞株を用いた実験による結果が cancer stem cell 培養系において再現されるかを確認し、臨床応用可能な化学療法増感開発の可

能性を探った。

### 3. 研究の方法

#### (1) グリオーマの化学療法耐性克服を目的とした G2 チェックポイント系キナーゼ阻害による化学療法剤増強効果の検討

Cyclin-dependent kinase 阻害剤 flavopiridol による G2 チェックポイント蛋白 cdc2 阻害作用の検索と、flavopiridol のグリオーマに対する化学療法増感剤としての可能性の検討は代表的ヒトグリオーマ細胞株である U87MG を用いて以下の実験を行った。

- ① 培養ヒトグリオーマ細胞 U87MG を用いた予備実験として、flavopiridol 単剤によるグリオーマ細胞に対する毒性の有無を薬剤処理後の集落形成能にて検討する。Flavopiridol は抗腫瘍作用があるとされており、米国においては臨床試験も行われているため、同剤単独処理においても抗グリオーマ作用が現れる可能性がある。同剤を用いた実験は G2 チェックポイント(TMZ 処理後 3 日目に活性化のピークを示す)関連蛋白の阻害能を中心とする(次項参照)ため、薬剤処理は様々な濃度で 3 日間として次項以降の実験の対照とした。
- ② Flavopiridol 単剤によってグリオーマ細胞に対する毒性が確認できた場合は、その毒性を示す濃度未満において flavopiridol が TMZ の作用を増強する可否かを検討する。具体的には TMZ でヒトグリオーマ細胞 U87MG を処理 (100  $\mu\text{M}$ 、3 時間) した後、様々な濃度の flavopiridol で後処理し、同剤による TMZ の殺細胞効果増強の有無を集落形成能で検討する。これと併せて TMZ によるグリオーマ細胞の G2 期細胞周期停止に対する flavopiridol の関与を検討する。細胞周期解析は DNA 染料 propidium iodine を用いた fluorescent activated cell sorter (FACS) で解析した。
- ③ TMZ と flavopiridol 併用処理細胞において G2 チェックポイント活性化の指標である cdc2 のリン酸化 (tyrosine 15) をリン酸化蛋白特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検討する。この他、G2 チェックポイント機構の上流の主要蛋白である Chk1、Chk2、cdc25C

についてもリン酸化蛋白に対する抗体が入手可能であるため、やはりウエスタンブロット法により、その TMZ 処理に対する反応(リン酸化)が flavopiridol 後処理により影響を受けるか否かを確認した。

- ④ FACS による細胞周期分布解析では G2 期と M 期とを明確に区別することは困難であり、我々がこれまでの研究で報告してきた TMZ によるグリオーマ細胞の G2 期細胞周期停止という現象が、純粋に G2 チェックポイント機構の活性化に基づくものではない可能性が否定できない。したがって、TMZ 処理後 U87MG 細胞における M 期関連蛋白 (Polo-like kinase 1, Pin1, aurora キナーゼなど)の変動および細胞内動態を、それぞれウエスタンブロット法および免疫細胞染色法を用いて検討した。同様の検討を TMZ と flavopiridol の併剤処理した細胞についても行った。

## (2) Akt キナーゼの化学療法剤抵抗性への関与について

抗細胞死作用を持つ Akt キナーゼに関する研究は、ヒトグリオーマ細胞株 U87MG を用い以下の検討を行った。

- ① 実験的検討の多くは代表的培養グリオーマ細胞 U87MG、およびこれに estrogen receptor (ER)と myristoylated Akt(活性型 Akt)との fusion protein をレトロウイルスベクターにより導入した細胞において 4 HT によって濃度依存性に Akt 活性を誘導できることを確認している(Hirose Y et al. Cancer Research 65: 4861-4869, 2005)。同細胞は 10% fetal bovine serum (dextran および chacoal 吸着操作によりステロイドホルモン除去済み)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, phenol red を含まないもの)で培養を行う。U87MG-Akt-Er-M(+)細胞に対する比較対照としては、U87MG に estrogen receptor (ER)と non-myristoylated Akt(非活性型 Akt)との fusion protein を導入した細胞 U87MG-Akt-Er-M(-)を作成・用意した。
- ② 上記のように作成した細胞において flavopiridol による TMZ 増強効果の有

無を検討した。詳細は項目 I と同様である。

## (3) 化学療法剤耐性細胞株の分離

我々は、予備実験において U87MG 由来 TMZ 耐性細胞株を得て、G2 チェックポイント機構を阻害すると同細胞株ですら再感受性化させることが可能であるとの知見を得ていたが、更に普遍的な研究結果を得るため、U87MG を段階的に増量した TMZ で処理することにより複数の薬剤耐性株を樹立し、これら同細胞における TMZ 再感受性化の可能性を検討した。

TMZ 耐性株は U87MG を一定期間(7日から10日)の間隔で各薬剤処理(低濃度から順次濃度を増加)して分離培養することで得るが、MGMT や Akt といった薬剤耐性に関与することが知られている蛋白については、その発現量の増加の有無をウエスタンブロット法にて解析した。

G2 チェックポイントの阻害が耐性株において TMZ の効果を再現できたため、検討課題 I と同様の検討を行った。

## (4) グリオーマ組織由来の cancer stem cell 培養系を用いた in vitro 検討

上記 I ~ III の内容を外科的に切除したグリオーマ組織由来の cancer stem cell 培養系(glioma stem cell; 以下 GSC と略する)を用いた in vitro での解析を行う。同細胞の培養は Singh SK et al. (Nature 432: 396-401, 2004)の方法に準じた。基本的には解析は上記 I と同様の内容を行うが III までの解析がアストロサイト由来細胞にて行われるのに対し、本検討での GSC を用いた解析は分離元腫瘍がオリゴデンドロサイト系であるものも含めて行うこととした。

## 4. 研究成果

### (1) グリオーマの化学療法剤耐性克服を目的とした G2 チェックポイント系キナーゼ阻害による化学療法剤増強効果の検討

培養ヒトグリオーマ細胞 U87MG において flavopiridol 単剤による細胞毒性が確認された(100nM 以上)。したがって、この濃度未満での使用によって TMZ 効果増強を検討することとし、以下の実験においては flavopiridol は 10nM で使用した。

- ① TMZ でヒトグリオーマ細胞 U87MG を処

理 (100  $\mu$ M、3時間) した後、様々な濃度の flavopiridol で後処理し、同剤による TMZ の殺細胞効果増強の有無を集落形成能で検討したところ、flavopiridol は TMZ の効果を増強した(図 1A)。この効果は p53 の機能に関係なく起こり、また FACS による細胞周期分布解析の結果では flavopiridol が TMZ 処理細胞の G2-M

図 1 A

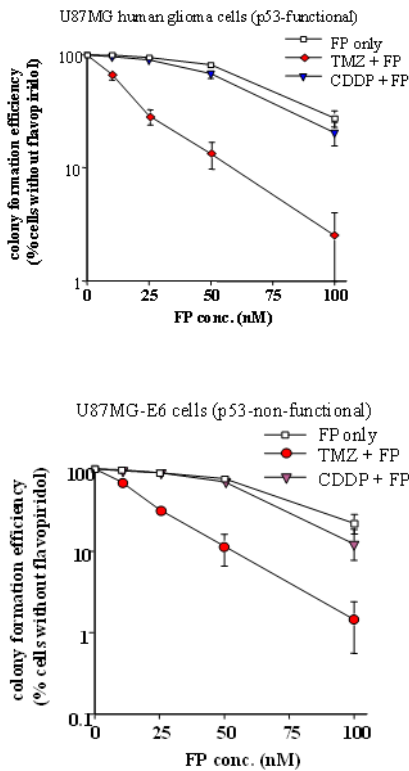
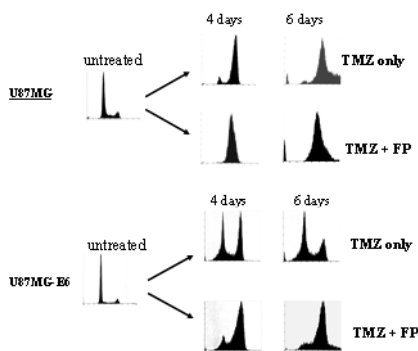


図 1 B

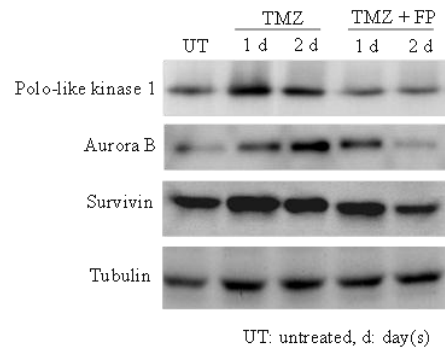


増強される polo-like kinase 1 の発現を阻害していることが示された(図 1B)。

- ② 更に G2-M 期移行に関連する蛋白の発現をウエスタンブロットで解析したところ、TMZ 処理によって増強される polo-like

kinase 1、aurora B、survivin の発現が flavopiridol によって抑制されることが明

図 2



らかになった(図 2)。

## (2) Akt キナーゼの化学療法剤抵抗性への関与について

U87MG に Akt-ER fusion protein を導入した -Akt-ER 細胞では、ER に連結した蛋白は外因性に加えられた 4-hydroxy tamoxifen (4HT) が ER と結合する事により機能を発揮するとされている(蛋白機能誘導系として確立した方法ではあるが詳細な機序は不明)。導入細胞は 10% fetal bovine serum (dextran および chacoal 吸着操作によりステロイドホルモン除去済み) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、phenol red を含まないもの) で培養を行った。既に線維芽細胞を Akt-ER を導入した実験系では 4 HT による Akt 活性誘導能は確認されていた(Akt 自己リン酸化能を抗リン酸化 Akt 抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した)ため、U87MG-Akt-ER でも同様の手法を用いて細胞内で Akt-ER が機能している事を確認し Akt 活性誘導の為に 4 HT の至適濃度は 10nM と決定した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、phenol red を含まないもの) で培養を行った。4 HT により Akt 活性誘導した U87MG-Akt-ER-M(+)細胞を DNA アルキル化剤 temozolomide (メチル化剤) または BCNU (エチル化剤) で細胞を処理 (50-100 mM、3時間) し、G2 期細胞周期停止(通常、薬剤処理後 2 日以内に認められる)が影響を受けるかを propidium iodine による DNA 染色を用いた FACS で解析し、G2 期

チェックポイントへの Akt 活性亢進の関与の有無は G2 チェックポイント蛋白(Chk1、cdc25C、cdc2 など)のリン酸化状態をウェスタンブロットで検討して解析した(図3A および B)。

図 3A

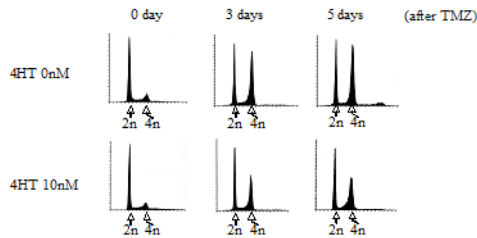
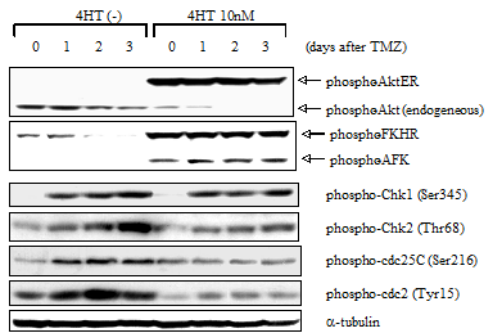
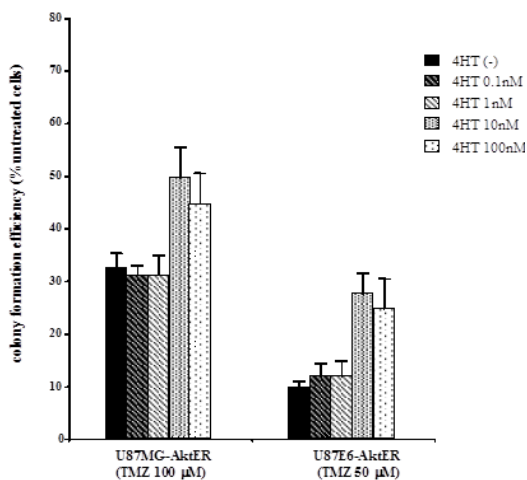


図 3B



U87MG-Akt-ER 細胞における TMZ の殺細胞効果を colony formation efficiency assay で評価した。Akt 活性化は p53 の機能に依存することなく TMZ に対する感受性を低下させた(図4)。

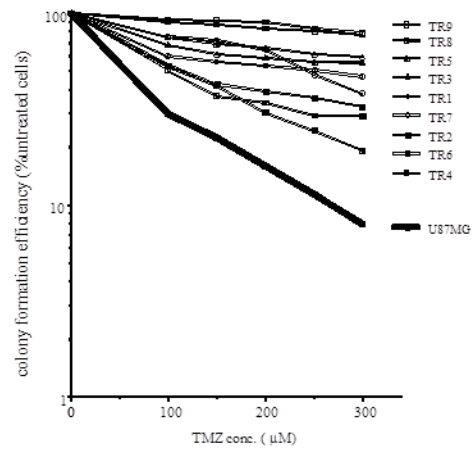
図 4



### (3) 化学療法剤耐性細胞株の分離

TMZ に対する耐性獲得の機序を解明するために、U87MG を段階的に増量した TMZ で処理しながら複数の薬剤耐性株を樹立した(図5)。

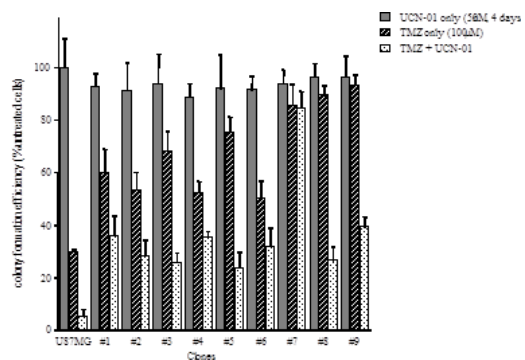
図 5



これらの TMZ 耐性株はいずれも MGMT 発現を示さず、TMZ 耐性が MGMT 発現上昇以外の機序で起こることを明確に示した。次いでこれらの耐性株における G2 チェックポイント阻害剤による TMZ 効果増強(再感受性化)の有無について検討した。

その結果、ほぼすべての耐性株で G2 チェックポイントキナーゼ(Chk1)阻害剤 UCN-01 は TMZ 再感受性化を誘導し、G2 チェックポイントを標的とした治療と TMZ 化学療法との併用がグリオーマの治療効果向上につながる可能性が示唆された(図6)。

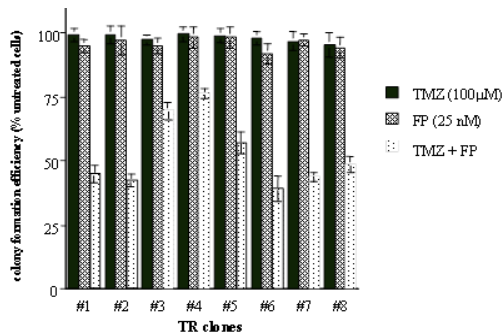
図 6



また cdc2 阻害効果のある flavopiridol による効果を同様に検討したところ、同剤でも UCN-01 の場合と同様に TMZ に対する再感受性化効果が見られた(図 7)。

また、flavopiridol は Akt 活性亢進に伴う

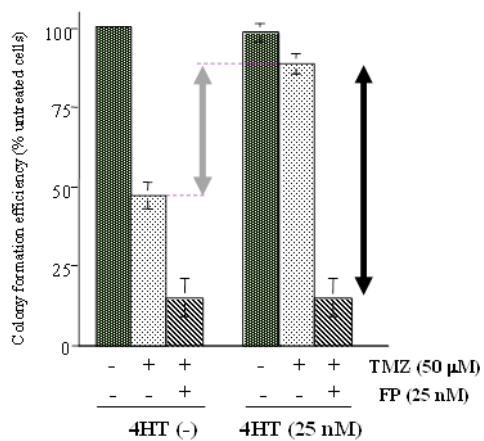
図 7



(flavopiridol の効果)

TMZ 感受性低下(図 8: 灰色矢印)も相殺する効果を示し(図 8: 黒矢印)、臨床上的問題の一つである Akt 活性亢進に対して G2 チェックポイント阻害療法が有効である可能性が示唆された(図 8)。

図 8



以上の解析結果から G2 チェックポイントが TMZ 感受性あるいは耐性を規定する因子と関連していることが強く示唆された。その因子は MGMT による DNA 脱メチル化以外の DNA 修復機構、具体的には DNA 二重鎖断裂修復(相同組換えまたは非相同組換え)と関連しているのではないかと考えられた。

#### (4) グリオーマ組織由来の cancer stem cell 培養系を用いた in vitro 検討

グリオーマ組織由来の cancer stem cell 培養系(glioma stem cell; GSC)の確立は当施設での腫瘍摘出術の際に採取されたグリオーマ組織を用いて、Singh SK et al. (Nature 432: 396-401, 2004)の方法に準じて行われた。現時点で実験系に用いるのに十分な条件を示す GSC は確立できておらず、上記で得られて知見を応用した解析は行われていない。今後、GSC が確立されれば動物脳内移植モデルを作成して in vivo での TMZ 増強法の検討を行う予定である。

Akt キナーゼ系の活性亢進によりヒトグリオーマ細胞における DNA アルキル化剤処理後の G2 期細胞周期停止機構が抑制される事が解明されたが、このことは G2 チェックポイント阻害による TMZ 処理後の細胞死の増強という事象とは反する結果のように見える。しかし、Akt が単なる細胞死抑制因子ではなく、DNA 修復につながる経路をも支配しているとすれば本研究で得られた結果は決して矛盾しない。

近年、DNA 損傷を受けた細胞が細胞周期進行を制御して DNA 修復を図る所謂 DNA チェックポイント機構と、細胞の化学療法剤に対する感受性との関係を示唆する報告がされているが、化学療法剤によって生じた DNA 損傷を腫瘍細胞が如何にして修復するかは重要な研究課題であり、この機構を解明することによりグリオーマの化学療法耐性獲得機構の解明につながる知見を得られる可能性がある。正常細胞においては G1 期を含む各細胞周期においてチェックポイントが機能しているため DNA 損傷に反応して G1 期細胞周期停止をきたすことが予想されるが、悪性グリオーマでは G1 期に細胞周期を停止する G1 チェックポイント機構に機能異常を認める事が多い(例: p53 の変異、p16 の発現低下)ため、G2 チェックポイント機構の重要性が大きいと考えられる。すなわち G2 チェックポイント機構の解析はグリオーマに対する化学療法の増感法開発につながる可能性があると考えられる。本研究においては前述の通り、G2 チェックポイント機構を阻害すると TMZ 耐性細胞株ですら再感受性化させることが可能であることが確認されており、G2 チェックポイント機構が細胞周期調節のみならず細胞保護作用にも

関わっていることを示唆されている。本研究では UCN-01 と flavopiridol といった 2 種類の全く標的が異なる 2 種の阻害剤を用いて解析を行ったが、いずれの場合においても G2 チェックポイント機構が DNA 修復機構と密接に関わることで細胞死を抑制する作用を持っているとすれば矛盾のない研究結果であり、腫瘍における DNA 修復機構の詳細を解明することが化学療法や放射線療法の感受性を検討するうえで重要になる可能性が高い。

前述の通り、MGMT は DNA アルキル化剤により形成されるアルキル化グアニン DNA を修復してしまうため、この酵素が高発現している腫瘍に対しては DNA アルキル化剤の治療効果は期待できないが、この点については近年臨床研究の場から注目される報告がされている。すなわち MGMT 発現低下腫瘍では TMZ とは無関係な治療に対しても反応性良好あるいは予後良好であることが示されている。したがって MGMT 以外の因子が TMZ 耐性に深く関与している可能性が強く、ここでも DNA 修復機構の一部に修飾が起きて TMZ 耐性につながっていることが予想される。

TMZ は O<sup>6</sup> 位メチル化グアニン (me-G) を形成し、それに引き続いた形成される DNA ミスマッチ(G:T)が DNA ミスマッチ修復機構(DNA mismatch repair system, MMR)を活性化することで二次的に DNA 二重鎖断裂に至り、それが細胞毒性を発揮するものと考えられている。したがって、理論的には MMR は TMZ 耐性に大きく関与すると考えられる因子である。臨床上的 TMZ 耐性症例においても特に再発腫瘍において同様の機序が存在する可能性があり。今後、グリオーマの TMZ 耐性症例に対する治療法の開発法を探るためには、MMR 機能異常細胞に対する治療法を考案する必要がある。また、MMR 異常が多いことが示唆される小児グリオーマに対する治療法として TMZ を用いた化学療法が妥当であるのかどうかを検討する必要もあるものと考えられる。

以上の知見より、化学療法剤処理を受けたグリオーマ細胞において如何なる細胞生物学的反応が起きているかを解析することは今後の新治療法開発に向けて有意義な情報を提供しうるものと考えられる。本研究では様々な化学療法に関して作用増強法の可能性を探るが、今後グリオーマに対する化学療法の中心的薬剤になる可能性のある TMZ に関する検討を重点的に行うことで、より臨床応用の可能性

の高い研究知見を得られるものと考えられる。

#### 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 6 件)

- (1) Ohba S, Hirose Y, Yoshida K, Yazaki T, Kawase T. Inhibition of 90-kD heat shock protein potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in human glioma cells. *Journal of Neurosurgery*. 112: 33-42, 2010 査読有
- (2) 廣瀬雄一 脳腫瘍の治療感受性 日本臨牀 68 (増刊号 10): 76-80, 2010 査読無
- (3) 廣瀬雄一 悪性グリオーマの集学的治療に向けての生物学 脳神経外科ジャーナル 19: 880-886, 2010 査読有
- (4) 廣瀬雄一 脳腫瘍 -診療・研究の最近の進歩- 現代医学 58 (2): 231-238, 2010 査読無
- (5) Ohba S, Hirose Y, Kawase T, Sano H. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase enhances temozolomide-induced toxicity in human glioma cells. *Journal of Neuro-oncology* 95(3):307-316, 2009 査読有
- (6) 廣瀬雄一 グリオーマの遺伝子異常 脳 21 12:, 21-25, 2009 査読無

[学会発表] (計 26 件)

- (1) 廣瀬雄一 グリオーマの遺伝学的解析と化学療法 日本脳神経外科学会中国四国地方会(招待講演) 平成22年12月4日 広島市
- (2) 大場茂生、廣瀬雄一 Chk1 阻害剤 UCN-01 による TMZ 耐性グリオーマ細胞のテモゾロミド感受性回復効果 第28回日本脳腫瘍学会 平成22年11月28日 軽井沢市
- (3) 廣瀬雄一 グリオーマの遺伝学的解析と化学療法 第5回鹿児島脳腫瘍セミナー(招待講演) 平成22年11月9日 鹿児島市
- (4) 廣瀬雄一, 佐々木光, 長谷川光広, ほか 悪性グリオーマにおける化学療法抵抗性とその克服への戦略 第69回日本脳神経外科学会学術総会 平成22年10月29日 福岡市
- (5) Ohba S, Sasaki H, Hirose Y, Chk1 inhibitor UCN-01 and cdk inhibitor flavopiridol



- re-sensitize temozolomide-resistant human glioma cells to temozolomide by increasing DNA damage. Congress of Neurological Surgeons 2010 Annual Meeting 平成22年10月16日 San Francisco, CA, USA
- (6) 佐々木光、廣瀬雄一、戸田正博ほか  
Low-grade gliomaの遺伝子診断とneoadjuvant approach 第15回脳腫瘍の外科学会 平成22年10月2日 大阪市
- (7) 廣瀬雄一 既存の膠芽腫治療の限界、新規治療による突破口の可能性：化学療法について 第11回日本分子脳神経外科学会(招待講演) 平成22年8月27日 仙台市
- (8) 廣瀬雄一、佐々木光、長谷川光広ほか 悪性グリオーマにおけるDNA修復機構の解析に基づいた新規化学療法開発の可能性 第11回日本分子脳神経外科学会 平成22年8月27日 仙台市
- (9) Hirose Y, Ohba S, Sasaki H. Glioma cells can acquire temozolomide resistance through enhanced DNA repair linked with G2 checkpoint activation. The 7<sup>th</sup> Meeting of Asian Society for Neuro-oncology 平成22年6月12日 韓国、ソウル
- (10) 廣瀬雄一 グリオーマのgenetic subgrouping 第28回日本脳腫瘍病理学会(招待講演) 平成22年5月21日 大阪市
- (11) Hirose Y. Cyclin-dependent kinase inhibitor enhances temozolomide-induced cytotoxicity in human glioma cells by suppressing DNA repair associated with G2 checkpoint. The 18<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research and Therapy 平成22年5月19日 ドイツ Travemünde
- (12) 廣瀬雄一 悪性グリオーマの集学的治療に向けての生物学 第30回日本脳神経外科コンgres総会(招待講演) 平成22年5月7日 横浜市
- (13) Hirose Y, Sano H Cdk inhibitor enhances DNA damage in human glioma cells treated with DNA-methylating agent temozolomide American Association for Cancer Research special conference 平成21年12月14日 San Diego, CA, USA
- (14) Hirose Y, Kanno T, Sano H. Temozolomide resistance of glioma cells could be overcome by Cdk inhibitor SNO-AANS/CNS Tumor Section Joint Meeting 平成21年10月23日 New Orleans, LO, USA
- (15) 廣瀬雄一、川瀬司、吉田耕一郎ほか 細胞周期制御機構を標的としたグリオーマのtemozolomide増感法開発の可能性 第68回日本脳神経外科学会総会 平成21年10月14日 東京
- (16) Hirose Y, Sano H. Biological responses of glioma cell to chemotherapeutic agent temozolomide 第14回World Congress of Neurological Surgery 平成21年9月4日 Boston, MA, USA
- (17) Hirose Y, Sano H. Cdk inhibitor blocks DNA repair following G2 checkpoint activation in human glioma cells treated with temozolomide 第3回 World Federation of Neuro-oncology 平成21年5月14日 横浜市
- (18) 西山悠也、廣瀬雄一、川瀬司ほか グリオーマにおける放射線学的特徴と遺伝学的特徴、その予後に関する関連性の解析 第27回日本脳腫瘍病理学会 平成21年5月9日 福岡市
- (19) Hirose Y, Ugawa F, Ohba S, et al. Cdk inhibitor blocks DNA repair following G2 checkpoint activation in human glioma cells treated with DNA-methylating agent temozolomide American Association for Cancer Research, the 100<sup>th</sup> Annual Meeting 平成21年4月21日 Denver, CO, USA
- (20) 廣瀬雄一 初発グリオーマ(G2)に対する治療法の検討 第3回東海脳腫瘍セミナー 平成20年12月2日 名古屋市
- (21) 廣瀬雄一、佐々木光、三輪点ほか グリオーマのテモゾロミド耐性獲得機構と細胞周期制御機構との関連性 第26回日本脳腫瘍学会 平成20年11月30日 松山市
- (22) 廣瀬雄一、佐々木光 DNA修復系の変化によるグリオーマ細胞のtemozolomide耐性獲得 第67回 日本癌学会学術総会 平成20年10月29日 名古屋市
- (23) 廣瀬雄一、佐々木光、三輪点、安倍雅人、川瀬司、長谷川光広、佐野公俊 グリオーマにおけるDNA修復能の変化とtemozolomide耐性獲得機構 第67回日本脳神経外科学会総会 平成20年10月3日 盛岡市
- (24) 廣瀬雄一、佐々木光、三輪点、佐野公俊 グリオーマのtemozolomide耐性獲得におけるDNA修復能変化の意義 第9回日本分子脳神経外科学会 平成20年8月31日 京都市
- (25) Hirose Y, Ohba S, Kawase T. et al. Cdk inhibitor flavopiridol enhances cytotoxic action of DNA-damaging agents on human glioma cells. The 17<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research and Therapy 平成20年6月10日 北海道 青沼
- (26) Hirose Y, Ugawa F, Ohba S, et al. Cdk inhibitor flavopiridol enhances cytotoxic action of DNA-damaging agents on human glioma cells. American Association for Cancer Research, the

99<sup>th</sup> Annual Meeting 平成20年4月13日  
San Diego, CA, USA

〔図書〕（計1件）

廣瀬雄一 腫瘍内アポトーシス - グリ  
オーマにおける細胞死 NS NOW No.5  
グリオーマ メジカルビュー社  
46-49,2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 雄一 (HIROSE YUICHI)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：60218849

(2) 研究分担者

佐々木 光 (SASAKI HIKARU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：70245512

(3) 連携研究者

宇川 布志子 (UGAWA FUJIKO)  
藤田保健衛生大学・医学部・研究補助員  
研究者番号：80465517