

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09334

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫の薬剤耐性へのDNA修復異常の関与の解明

研究課題名(英文) Association of drug resistance of human malignant glioma cells and DNA repair system

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫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アルキル化剤テモゾロミド(TMZ)で反復処理することで薬剤に対する耐性細胞株を複数分離した。全ての耐性株ではDNA修復酵素O6-methylguanine methyltransferaseの発現は認められず、他の機序の関与が大きいと考えられた。耐性株の特徴は大きく2分され、一群ではDNA二重鎖断裂の形成までは起こっているものの、その後のDNA相同組み換え修復が亢進して細胞死を抑制していることが確認された。他方、DNAミスマッチ修復機構の異常によってTMZの毒性が発揮されない群では非常に強い耐性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法剤に対する細胞内での生物学的応答を解明することは脳腫瘍学の発展の上で重要な意義があるが、特にDNA修復機構(MMR)と細胞生存維持機構の関連を解明することは腫瘍の治療耐性獲得機序の解明につながり、新たな化学療法プロトコルの開発や将来の新規薬物療法の開発のための基盤形成になり得る。特に投与回数についての科学的根拠がないTMZ化学療法において、長期反復投与により感受性のある細胞にも薬剤耐性が獲得されるために投与スケジュールの適切化を検討する必要があること、および新規薬剤のDNAアルキル化剤との併用療法は腫瘍再発の前に試みる必要性があることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of drug resistance in malignant glioma, we isolated multiple drug-resistant cell lines by repeatedly treating the U87MG cell line with low concentrations of the DNA alkylating agent temozolomide (TMZ). None of the resistant strains showed expression of the DNA repair enzyme O6-methylguanine methyltransferase, suggesting that other mechanisms are involved in acquired resistance. The characteristics of the resistant strains were roughly divided into two groups. In one group, although the formation of DNA double-strand breaks occurred, it was confirmed that subsequent DNA homologous recombination repair was enhanced and, thus, cell death was suppressed. On the other hand, a group in which the toxicity of TMZ was not exhibited due to the dysfunction of DNA mismatch repair mechanism was established after longer exposure to TMZ, and showed very strong tolerance against TMZ.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫 薬剤耐性 DNAミスマッチ修復 G2チェックポイント

### 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は全悪性腫瘍の中でも生命予後が不良な腫瘍に属し、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(Stupp R et al. Lancet Oncol. 10: 459-466, 2009)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。

### 2. 研究の目的

グリオーマ細胞の生物学、特に腫瘍特異的なDNA修復機構は化学療法剤に対する耐性に深く関与していることが推測できるため、この点に関する検討を行い、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とすることを目指して研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### I TMZ耐性細胞におけるDNA修復能の解析

我々はこれまでの研究過程で、悪性神経膠腫の薬剤耐性機構を解明するために、細胞株U87MGを低濃度のTMZで反復処理することで同剤に対する耐性細胞株を複数分離した。全ての耐性株ではDNA修復酵素O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase(MGMT)の発現は認められず、他の機序の関与が大きいと考えられた。耐性株での細胞周期制御を解析したところ、これらの中にはDNAメチル化剤であるTMZによる処理に伴って一時的なG2期細胞周期停止を示すものと、全く細胞周期停止を示さないものとに大別されることが判明した。これらのTMZ耐性細胞におけるDNA修復能を解析することは、今後の新規治療法開発のための重要な課題である。以下の研究ではこれらのTMZ耐性株を用いた実験を行った。

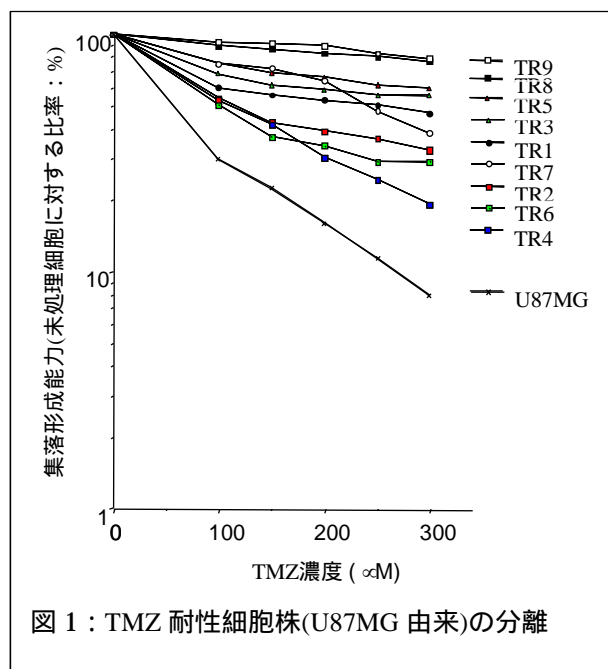


図1: TMZ耐性細胞株(U87MG由来)の分離

#### (1) DNA相同組換え修復についての解析

一時的なG2期細胞周期停止を示す細胞株(図1中では中程度の耐性を示す群、および図2参照)においてはある程度のDNA障害が生じていると考えられ、G2期細胞周期停止に強く関与するChk2キナーゼの活性化、すなわちDNA二重鎖断裂の形成までは起こっていると予想されるため、その後のDNA修復が亢進して細胞死を抑制しているとの仮説を得られる。

そこで、これらの株をDNA相同組み換え修復の重要因子であるRad51のsiRNA処理した上で

TMZ を加え、薬剤耐性が解除されるか否かを検討する。実際に TMZ で DNA 二重鎖断裂が生じているについては  $\gamma$ -H2AX に対する免疫細胞化学を行うことで定量的に評価した。

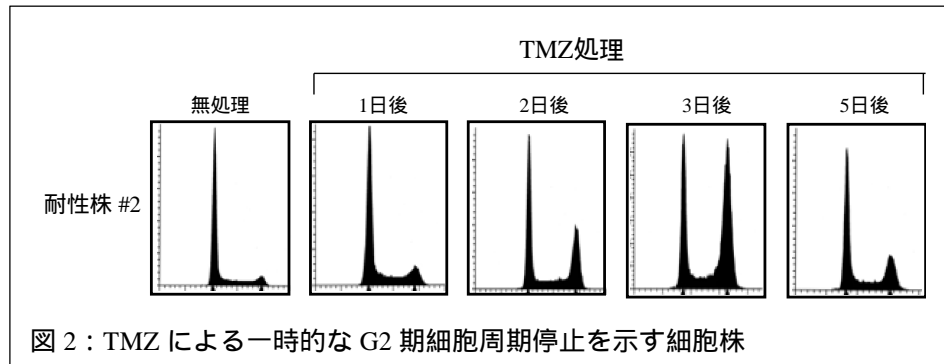


図 2 : TMZ による一時的な G2 期細胞周期停止を示す細胞株

## (2) DNA ミスマッチ修復についての解析

一方、TMZ による G2 期細胞周期停止を全く示さない株 (図 1 中では TMZ 処理後の最も高い集落形成能を示す群、および図 3 参照) においては TMZ による DNA 損傷が非常に弱いと考えられ、TMZ 耐性という観点でも最も重要な研究対象となる細胞株である。既に MGMT による耐性機序が否定的であるデータが得られているため、DNA ミスマッチ修復機構 (MMR) の異常によって毒性が発揮されない状況が疑われる。

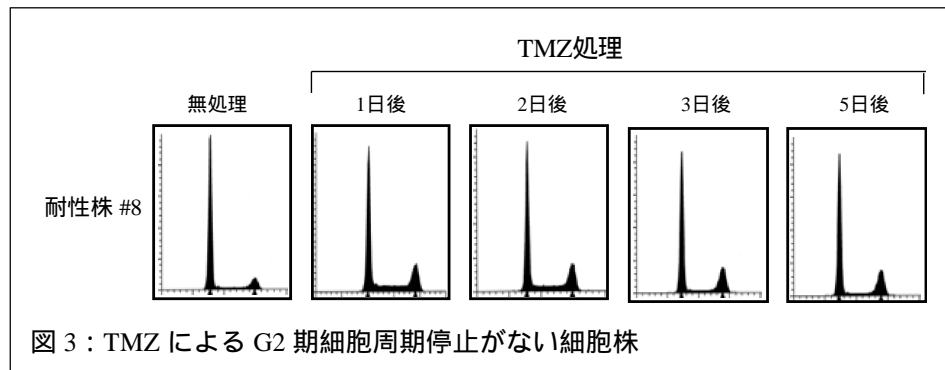


図 3 : TMZ による G2 期細胞周期停止がない細胞株

予備実験において MMR 蛋白である MSH6 や MLH1 の発現低下を示す細胞も確認されているため、この 2 つの蛋白の他、MSH2 などの主要因子についての発現解析(ウエスタンブロットによる)を行った。また、TMZ による G2 期細胞周期停止の欠如が G2 チェックポイント異常によるものではないことを確認するために、Chk1、Chk2、cdc2 といった G2 チェックポイント蛋白の発現を解析した(全蛋白およびリン酸化蛋白の増減をウエスタンブロットで解析)。

## II TMZ 耐性株を用いた網羅的遺伝子解析による細胞生存維持機構の解析

上述の TMZ 耐性株はいずれにおいても何らかの DNA 修復異常が生じていると考えられるが、それはゲノム不安定性につながるため、本来なら細胞が安定して増殖していくには不利な特性になる。したがって耐性株は細胞生存維持に関与する特性を獲得していることが予想され、その解明を目的として、各耐性株に対して網羅的マイクロアレイ解析(mRNA、マイクロ RNA、メチル化 DNA)を行うことで薬剤耐性に関与する蛋白の同定を目指す。複数の耐性株についての解析を加えることにより薬剤耐性機序に関わる共通の因子の解明が可能であると考えられる。耐性株では MMR に異常が生じている可能性が高いため、comparative genomic hybridization (CGH)法及び次世代シーケンサーを用いて染色体不安定性(chromosomal instability または genomic instability)を解析することにより TMZ 耐性獲得に伴う遺伝子変異導入の程度を評価した。本実験については結果の再現性を確認途中であり、研究継続を行うこととした。

### III 臨床検体を用いた MMR 変化の解析による TMZ 治療適正化のための基盤形成

TMZ による治療後に再発した膠芽腫においては MMR 蛋白の発現低下があることは臨床例においても報告がされていたが、我々の実予備験結果は薬剤処理条件を揃えた *in vitro* 実験においても MMR 障害が化学療法耐性に関与することを示唆するものである。また耐性株分離までの間の DNA メチル化剤処理回数が多いほど、MMR 障害を認める頻度が高くなる可能性もあり、そうであれば臨床例において当初は化学療法剤に反応した腫瘍が薬剤耐性を獲得する過程を説明することが可能である。

このことは投与回数についての科学的根拠がない TMZ 化学療法において、長期反復投与により感受性のある細胞にも薬剤耐性が獲得されるために投与スケジュールの適切化を検討する必要があること、および新規薬剤の DNA アルキル化剤との併用療法は腫瘍再発の前に試みる必要性があることを示すものである。

我々の研究室では TMZ 治療を行なったグリオーマ症例について、IDH 変異、1p19q 共欠失をはじめとしたグリオーマに特徴的な遺伝子異常を解析済みであり、過去 10 年以上の症例について現在の WHO 分類 (2016) に沿った形での診断が可能であり、また一部については TMZ 治療前後の腫瘍検体がある (再発時に手術がされた症例)。これらの症例から得られた腫瘍検体を用いて、MMR 蛋白の発現状況の変化を解析し(免疫組織化学)、腫瘍再発様式 (悪性度の変化)、生命予後との関係、再発後治療への反応性などを解析した。本実験については統計的検討が可能な解析結果の蓄積に至っておらず、研究継続を行うこととした

#### 4. 研究成果

悪性神経膠腫の薬剤耐性機構を解明するために、細胞株 U87MG を低濃度の TMZ で反復処理することで同剤に対する耐性細胞株を複数分離した。全ての耐性株では DNA 修復酵素 O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) の発現は認められず、他の機序の関与が大きいと考えられた。耐性株での細胞周期制御を解析したところ、これらの中には DNA メチル化剤である TMZ による処理に伴って一時的な G2 期細胞周期停止を示すものと、全く細胞周期停止を示さないものとに大別されることが判明した。一時的な G2 期細胞周期停止を示す細胞株においてはある程度の DNA 障害が生じていると考えられ、G2 期細胞周期停止に強く関与する Chk2 キナーゼの活性化、すなわち DNA 二重鎖断裂の形成までは起こっていると予想されるため、その後の DNA 修復が亢進して細胞死を抑制しているとの仮説が得られた。そこで、これらの株を DNA 相同組み換え修復の重要因子である Rad51 の siRNA 処理したところ TMZ に対する薬剤耐性が解除されることが確認された。実際に TMZ で DNA 二重鎖断裂が生じていることは gamma-H2AX に対する免疫細胞化学を行うことで定量的に評価、確認された。一方、TMZ による G2 期細胞周期停止を全く示さない株においては DNA ミスマッチ修復機構(MMR)の異常によって毒性が発揮されない状況が疑われ、MMR 蛋白である MSH6 や MLH1 の発現低下が確認された。MSH2 などの他の主要因子については発現に大きな変化は認めなかった。また、TMZ による G2 期細胞周期停止の欠如が G2 チェックポイント異常によるものではないことは Chk1、Chk2、cdc2 といった G2 チェックポイント蛋白の発現に変化がないことにより確認された。

一方、予備実験からは G2 チェックポイント機構を阻害すると TMZ 耐性を得た細胞株ですら再感受性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 DNA 修復にも関わっている可能性は高く、今後の重要な研究課題になることが示された。化学療法剤によって DNA 損傷を受けたグリオーマ細胞内での生物学的応答を解明することは脳腫瘍学の発展の上で重要な意義があるが、特にグリオーマ細胞内での DNA 修復機構 (MMR)

と細胞生存維持機構の関連を解明することは腫瘍の治療耐性獲得機序の解明につながり、化学療法によるグリオーマの治療効果改善には不可欠な課題であり、新たな化学療法プロトコルの開発や将来の新規薬物療法の開発のための基盤形成になり得ると考え、本研究の着想に至った。これまでに、グリオーマの化学療法耐性に関する研究報告は乏しく、MMR 異常細胞の詳細な解析は独自性が高いと考えるため、今後も研究を継続する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohba Shigeo, Yamashiro Kei, Hirose Yuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of DNA Repair in Combination with Temozolomide or Dianhydrogalactinol Overcomes Temozolomide-Resistant Glioma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2570 ~ 2570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13112570	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 -
1. 著者名 Nakae Shunsuke, Kumon Masanobu, Murayama Kazuhiro, Ohba Shigeo, Sasaki Hikaru, Inamasu Joji, Kuwahara Kiyonori, Yamada Seiji, Abe Masato, Hirose Yuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of preoperative seizures with tumor metabolites quantified by magnetic resonance spectroscopy in gliomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86487-6	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 -
1. 著者名 Ohba Shigeo, Kuwahara Kiyonori, Yamada Seiji, Abe Masato, Hirose Yuichi	4. 巻 37
2. 論文標題 Correlation between IDH, ATRX, and TERT promoter mutations in glioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-020-00360-4	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 YAMASHIRO KEI, NAKAO KAZUTAKA, OHBA SHIGEO, HIROSE YUICHI	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	中江 俊介  (Nakae Shunsuke)  (20622971)	藤田医科大学・医学部・講師   (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)	

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