

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591878

研究課題名（和文） 中枢神経悪性リンパ腫の予後規定マーカーの解明

研究課題名（英文） Elucidation of prognostic marker for primary central nervous system lymphoma

研究代表者

三島 一彦（MISHIMA KAZUHIKO）

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00282640

研究成果の概要（和文）：中枢神経悪性リンパ腫（PCNSL）は難治性の脳腫瘍である。PCNSL に対する標準治療は大量 Methotrexate（MTX）を中心とする化学療法とそれに引き続き行なう全脳照射であるが、30%の症例は治療抵抗性であり、60%が再発する。再発や治療抵抗性の PCNSL に対してテモゾロミド（TMZ）が有効な症例が存在する。本研究では PCNSL 治療に重要な役割を占める化学療法剤である TMZ 及び MTX の薬剤感受性に関わるマーカー候補である MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化、reduced folate carrier（RFC）遺伝子の発現について検討し、化学療法剤の効果、治療成績との関係について検討した。

研究成果の概要（英文）：High-dose methotrexate (HD-MTX)-based chemotherapy with whole brain irradiation improves the prognosis of PCNSL. However, up to 30% of patients are refractory to primary therapy and 60% relapse. Thus, novel treatment regimens for PCNSL are needed. Favorable responses to temozolomide chemotherapy have recently been reported in PCNSL patients who are refractory or relapsed to HD-MTX. The gene encoding the DNA repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is transcriptionally silenced by promoter methylation in several human tumors, including gliomas and systemic lymphomas. MGMT promoter methylation is also a prognostic marker in glioblastoma patients treated with temozolomide. To validate temozolomide treatment in PCNSL, we applied methylation-sensitive high resolution melting analysis to quantitate MGMT methylation in PCNSL. MGMT promoter methylation was detected in tumors from 23 (51%) of 45 PCNSL patients, 11 of which were considered to have high (more than 70.0%) methylation status. Of the five recurrent PCNSLs treated with temozolomide, four cases responded, with three achieving complete response and one, a partial response. All four responsive PCNSLs had methylated MGMT promoters, whereas the non-responsive recurrent PCNSL did not. Thus, the use of quantitative MS-HRM analysis for the detection of MGMT promoter methylation has been suggested in PCNSL for the first time. MGMT promoter methylation may become a useful marker for predicting the response of PCNSLs to temozolomide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

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：中枢神経悪性リンパ腫, temozolomide, methotrexate, MGMT, reduced folate carrier, 化学療法

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (PCNSL) は、中枢神経系内に原発したと診断できる節外性リンパ腫の一型で、大部分は非ホジキンリンパ腫で B 細胞由来のびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) である。脳腫瘍全国統計によれば、PCNSL は 10 万人に年間 0.33 人の頻度で発生するとされるが、近年明らかな増加傾向を示し、治療が最も困難な悪性脳腫瘍の 1 つである。現時点での PCNSL に対する最も有効な治療法は、大量 Metotrexate (HD-MTX) とそれに引き続いて行われる放射線治療である。放射線治療のみでは生存期間中央値 12 ヶ月のものが、HD-MTX に照射を併用することで 33-39 ヶ月にまで延長したが、初期治療に抵抗性を示す症例が 30%、初期治療後完全緩解にいたっても 60% が再発し、さらなる治療に奏功するのは 50% に満たない。再発・治療抵抗性 PCNSL に対し現時点で確立された治療法はないが、その理由の 1 つとして血液脳関門 (BBB) が存在するために抗がん剤の脳内への浸透が妨げられることが考えられている。従って PCNSL に有効であり、かつ BBB を通過する抗がん剤は PCNSL の新たな治療法開発につながると考えられる。経口アルキル化剤である Temozolomide (TMZ) は悪性神経膠腫に対して有効性が示され、血漿中など生理的条件下で容易に加水分解されメチルトリアゼン誘導体である

5-(3-methyltriazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC) に変換される。MTIC は活性本体であるメチルジアゾニウムイオンの中間型であり、極めて不安定であることから、すみやかにメチルジアゾニウムイオンと副産物 6-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) に分解され、このメチルジアゾニウムイオンが DNA のグアニンの O⁶ 位にメチル基を付加してアルキル化を起こすことにより、細胞増殖抑制作用を示す。TMZ は BBB を通過する薬剤であることから、神経膠腫のみならず PCNSL に対しても治療効果が期待されている。Reni らは再発 PCNSL に対する TMZ 単剤の効果を報告した。それによると 36 例の再発 PCNSL に対し、TMZ を 150mg/m²/day 5 日間を 4 週毎に 6 サイクル投与した結果、奏功率 31%、全生存期間中央値 3.9 ヶ月、無増悪生存期間中央値 2.8 ヶ月、1 年生存率 31%であった。有害事象は Grade 3-4 の血液毒性と消化器症状が

2%であった (Reni M et al. Temozolomide as salvage treatment in primary brain lymphomas. Br J Cancer. 96:864-867. 2007)。このように TMZ は PCNSL に有効な化学療法剤であり、毒性も少なく PCNSL の治療として期待できる。我々は再発 PCNSL に対して TMZ の投与を行い、その有効性を確認し報告しているが、中でも TMZ が極めて有効な例と無効例が存在することがわかってきた。悪性神経膠腫では TMZ の有効性が期待できるファクターの 1 つとして腫瘍での O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 遺伝子プロモーターのメチル化の有無が重要とされている (Hegi ME et al. N Engl J Med. 352:997-1003. 2005)。すなわち、MGMT 遺伝子のプロモーターにメチル化が存在してその発現が低下している腫瘍の方が、TMZ による DNA 損傷の修復が起こらず薬が効きやすいというものである。しかし PCNSL において MGMT 遺伝子の状態が TMZ の治療効果のマーカーとなりうるかの検討はされていない。また PCNSL 初期治療に使用する MTX の薬剤耐性には、MTX の腫瘍細胞内への取り込みに必要な reduced folate carrier (RFC) の発現が関与していることが骨肉腫や白血病で示されており (Guo W et al. Clin Cancer Res; 5: 621-627, 1999)、その発現には RFC 遺伝子プロモーターのメチル化が関与することが示唆されている。しかし PCNSL の MTX 耐性に RFC 遺伝子の発現が関与しているかはこれまで検討されていない。

2. 研究の目的

PCNSL 症例において、腫瘍組織での MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化の状態を検討しその程度と頻度を明らかにする。PCNSL に対して TMZ による治療を行なった症例での TMZ 有効性と MGMT プロモーターメチル化との関連を明らかにし、MGMT プロモーターのメチル化が TMZ 治療の効果予測因子となるかを検討する。また、HD-MTX の薬剤感受性に RFC 遺伝子の発現が関与するかについて検討し、RFC の発現が HD-MTX 治療の効果予測因子となりうるかを検討する。

3. 研究の方法

PCNSL 症例 45 例の腫瘍組織より DNA を抽出し、MGMT 遺伝子に対するメチル化感受性高解像能融解曲線分析法にて、MGMT 遺伝子のプロモ

ーターのメチル化の有無を解析した(図1)。Bisulfite 処理した各 DNA サンプル 0.2 µg を最終容量 20 µl に溶解した。メチル化スタンダードは、100%メチル化コントロール DNA を 100%非メチル化コントロールで希釈して 100%から 0%まで 10%毎に段階希釈したサンプルを準備した。PCR primer は Wojdacz らの論文に従ってデザインした。DNA インターカレート色素を含む LightCycler480 High Resolution Melting マスターミックスを使用し、PCR の条件は SYBR Green I 検出フォーマットにて、95 10分 X 1 サイクル、95 10秒、60 20秒、72 20秒 X 45 サイクル、高解像能融解曲線分析法のステップとして、95 1分、50 1分、72 5秒反応させた後、95 へ向かって1 につき 30回連続して蛍光を取得した。

HD-MTX 療法の感受性に関与する可能性がある RFC 遺伝子については、36 例の PCNSL 組織切片を用いて、抗 RFC 抗体による免疫組織染色法にて RFC タンパクの発現を検討した。

4. 研究成果

45 例中 MGMT のメチル化は 23 例 51%で確認できた。メチル化の程度は 5%から 100%まで存在し、11 例では 70%以上と高いメチル化を示した(表1)。

表1. PCNSL 症例の MGMT プロモーターメチル化の程度

Degree of MGMT promoter methylation (%)	No.
<4.0 (=unmethylated cases)	22
4.1 9.9	3
10.0 19.9	1
20.0 29.9	2
30.0 39.9	2
40.0 49.9	2
50.0 59.9	0
60.0 69.9	2
70.0 79.9	4
80.0 89.9	2
90.0 100.0	5

再発時に TMZ 療法を導入した 5 例中 4 例(図2: 症例 1,2) は MGMT のメチル化がみられ、これらの症例では治療に奏功した。一方 MGMT のメチル化がみられない 1 例(図2: 症例 3)

では TMZ の効果を認めなかった。従って MGMT のメチル化は TMZ の効果を予測する因子となりうる可能性が示唆された。HD-MTX 療法の感受性と RFC の発現を検討できたのは PCNSL 36 例であった(表 2)。RFC の発現を認めたのは 25 例で、うち MTX 療法が有効(CR, PR)であったのは 21 例(84%)であった。RFC の発現を認めない 11 例中 HD-MTX 療法に抵抗性(SD, PD)を示した症例は 8 例(72%)であった。また MTX 奏効例 24 例中 RFC 陽性例は 21 例(87.5%)で、治療抵抗 12 例中 8 例(67%)で RFC の発現を認めなかった。以上より RFC のタンパク発現は HD-MTX 療法の感受性と相関があり(P=0.0018)、HD-MTX 療法の効果を予測しうるマーカーとなる可能性が示唆された。

図1. メチル化感受性高解像能融解曲線分析法による MGMT 遺伝子プロモーターメチル化の解析

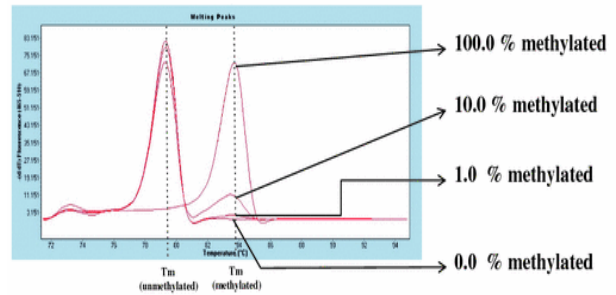
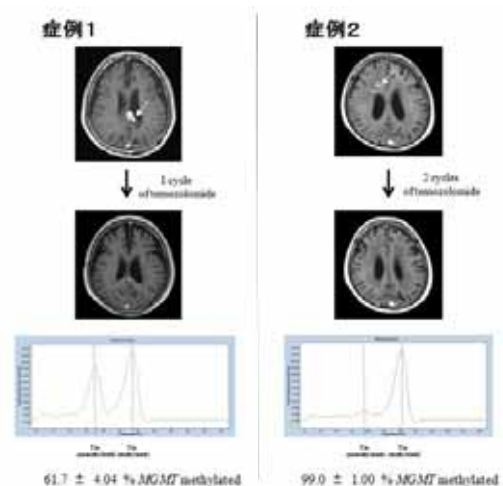


図2. TMZ で治療した再発 PCNSL 症例と MGMT プロモーターメチル化の関係



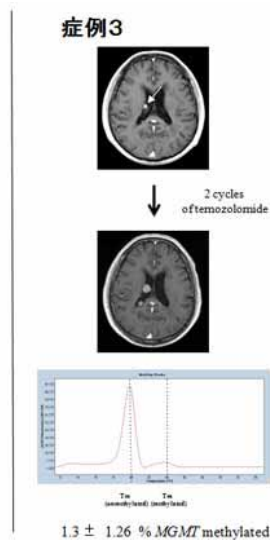


図 3. 免疫組織染色を用いた RFC タンパクの発現

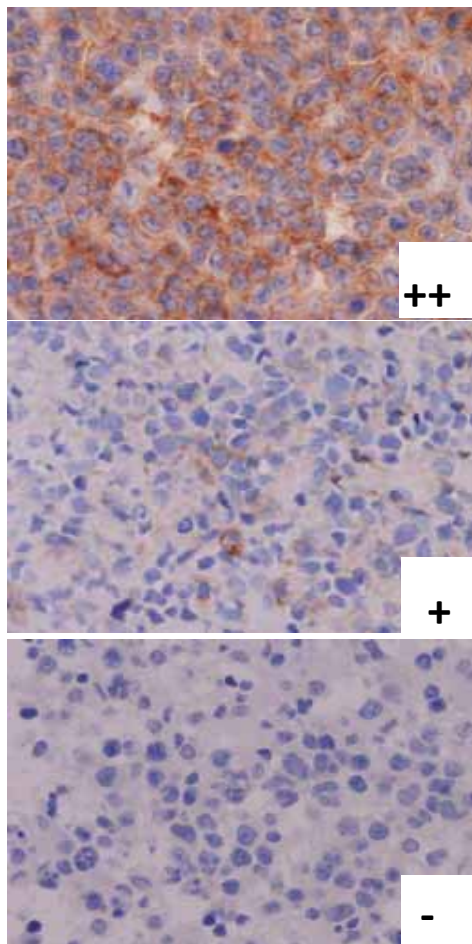


表 2. HD-MTX の治療効果と RFC 染色の関係

HD-MTX Response \ RFC expression	SD+PD	CR+PR
RFC -	8	3
RFC +, ++	4	21
Total	12	24

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 11 件)

三島一彦: 再発中枢神経系原発悪性リンパ腫の治療. 癌と化学療法 査読無、39:898-905, 2012

三島一彦: 中枢神経系原発悪性リンパ腫の治療: update, Annual review 神経 鈴木 則宏 他 編集 中外医学社 査読無、191-201, 2012

Adachi J, Mishima K, Wakiya K, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Matsutani M, R. Nishikawa R: O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in 45 primary central nervous system lymphomas: Quantitative assessment of methylation and response to temozolomide treatment. J Neurooncol. Neurooncol. 査読有、107:147-53, 2012

三島一彦, 安達淳一, 脇谷健司, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 松谷雅生, 西川 亮: テモゾロミド導入後の高齢者初発膠芽腫に対する治療成績 Geriatric Neurosurgery 査読無、23:13-21, 2011

Adachi J, Totake K, Mishima K, Suzuki T, Wakiya K, Yanagisawa T, Matsutani M, Nishikawa R. Methylation-sensitive high-resolution melting analysis: Quantitative assessment of MGMT promoter methylation in high-grade gliomas. Neuro-Oncology 査読有、12: 31, 2010

Mishima K, Adachi J, Suzuki T, Wakiya K, Yanagisawa T, Fukuoka K, Nishikawa R: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in

elderly patients Neuro-oncology 査読有、
12: iii46, 2010

三島一彦: 悪性神経膠腫と中枢神経原発
悪性リンパ腫に対する temozolomide の臨床
開発の現況と展望. 血液・腫瘍科 査読無、
61. 541-549, 2010

三島一彦: 中枢神経系原発悪性リンパ腫
の病理と遺伝子. 日本臨床 査読無、 68.
193-202, 2010

三島一彦、藤巻高光: 中枢神経原発悪性リ
ンパ腫の最新の治療法は. EBM 神経疾患の治
療 2009-2010 査読無、岡本幸市 他編集 中外
医学社 196-202, 2009

Adachi J, Totake K, Mishima K, Wakiya K,
Suzuki T, Yanagisawa T, Matsutani M,
Nishikawa R: Methylation-sensitive
high-resolution melting analysis :
Quantitative assessment of MGMT promoter
methylation in gliomas. Neuro-Oncology 査
読有、 11: 945, 2009

Mishima K, Suzuki T, Uemiya N, Adachi J,
Wakiya K, Ishihara S, Yamane F, Matsutani
M, Nishikawa R: Immunochemotherapy with
rituximab in conjunction with blood-brain
barrier disruption and an ICE regimen for
relapsed or refractory primary primary CNS
lymphomas (PCNSL). Neuro-oncology 査読
有、 11: 231, 2009

[学会発表](計 24 件)

安達淳一、脇谷健司、三島一彦、鈴木智成、
福岡講平、柳澤隆昭、榎山 浩、西川 亮:
脳腫瘍患者のてんかん治療に対する新規抗
てんかん薬 Levetiracetam の有用性 第 29 回
日本脳腫瘍学会学術集会、下呂、
2011.11.27-29

三島一彦、脇谷健司、鈴木智成、安達淳一、
福岡講平、柳澤隆昭、西川 亮:再発中枢神
経系原発悪性リンパ腫に対する抗体化学療
法 第 29 回日本脳腫瘍学会、岐阜、
2011.11.27-29

Adachi J, Suzuki T, Yanagisawa T,
Fukuoka K, Mishima K, Wakiya K, Matsutani
M, Nishikawa R: MGMT promoter
methylation status in newly diagnosed
pediatric gliomas. 16th annual
scientific meeting of the society for
neuro-oncology, Orange County, California,

USA, 2011.11.17-20

安達 淳一、鈴木 智成、福岡 講平、柳澤
隆昭、脇谷 健司、三島 一彦、松谷 雅生、
藤巻 高光、西川 亮: 小児 glioma における
IDH1 変異についての解析. 日本脳神経外科
学会第 70 回学術総会、横浜、2011.10.12-14

三島一彦、脇谷健司、鈴木智成、安達淳一、
福岡講平、柳澤隆昭、西川 亮: 再発中枢神
経系悪性リンパ腫に対する治療戦略: 抗体化
学療法の有効性. 日本脳神経外科学会第 70
回学術総会、横浜、2011.10.12-14

Adachi J, Suzuki T, Yanagisawa T, Fukuoka
K, Mishima K, Wakiya K, Matsutani M,
Nishikawa R: MGMT promoter methylation
status in newly diagnosed pediatric
gliomas. 8th meeting of Asian Society
for Neuro-Oncology, Suzhou, China,
2011.6.26-29

安達淳一、脇谷健司、三島一彦、鈴木智成、
柳澤隆昭、福岡講平、松谷雅生、佐々木惇、
西川 亮 : 再発 Anaplastic
oligodendroglioma に対する Bevacizumab 投
与後の病理像. 第 29 回 日本脳腫瘍病理学
学会学術集会、東京、2011.5.20-21

安達淳一、鈴木智成、柳澤隆昭、三島一彦、
福岡講平、脇谷健司、松谷雅生、佐々木惇、
西川 亮 : 初発小児 glioma における MGMT 遺
伝子メチル化解析. 第 29 回日本脳腫瘍病理
学会学術集会、東京、2011.5.20-21

三島一彦、脇谷健司、安達淳一、鈴木智
成、福岡講平、柳澤隆昭、松谷雅生、西川
亮: 分子標的薬 悪性脳腫瘍に対する分子
標的治療の現況と展望 第 28 回日本脳腫
瘍学会学術集会、軽井沢、2010.11.28-30

安達淳一、鈴木智成、柳澤隆昭、三島一彦、
福岡講平、脇谷健司、松谷雅生、西川 亮:
小児 glioma における MGMT 遺伝子メチル化解
析. 日本脳神経外科学会第 69 回学術総会、
福岡、2010.10.27-29

三島一彦、安達淳一、脇谷健司、鈴木智
也、柳澤隆昭、松谷雅生、西川 亮: 高齢
者膠芽腫に対する手術、照射、化学療法ーテ
モゾロミド導入後の治療成績 日本脳神
経外科学会第 69 回学術総会、福岡、
2010.10.27-29

Adachi J, Totake K, Mishima K, Suzuki T,
Wakiya K, Yanagisawa T, Matsutani M,

Nishikawa R: Methylation-sensitive high resolution melting analysis: Quantitative assessment of MGMT promoter methylation in high-grade gliomas. 9th Meeting of The European Association of Neurooncology, Maastricht, Netherlands, 2010.9.16-19

Mishima K, Adachi J, Suzuki T, Wakiya K, Yanagisawa T, Fukuoka K, Nishikawa R: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients The 9th meeting of the European Association of NeuroOncology Maastricht Netherland, 2010.9.16-19

Adachi J, Totake K, Mishima K, Wakiya K, Suzuki T, Yanagisawa T, Fujimaki T, Matsutani M, Nishikawa R: Methylation-sensitive high resolution melting analysis: a new quantitative assessment of MGMT promoter methylation in high-grade gliomas. The 18th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Trvemuende, Germany, 2010.5.18-20

Mishima K, Adachi J, Suzuki T, Wakiya K, Yanagisawa T, Fukuoka K, Nishikawa R: Chemo-Immunotherapy with Osmotic Blood-Brain Barrier Opening for Recurrent or Refractory Primary CNS Lymphoma. The 18th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. Trvemuende, Germany.2010.5.18-20

三島一彦, 安達淳一, 脇谷健司, 鈴木智也, 柳澤隆昭, 松谷雅生, 西川 亮: テモゾロミド導入後の高齢者初発神経膠芽腫に対する治療成績. 第 23 回日本老年脳神経外科学会, 松山, 2010.3.26

三島一彦, 安達淳一, 脇谷健司, 鈴木智也, 柳澤隆昭, 藤巻高光, 松谷雅生, 西川 亮: 高齢者初発神経膠芽腫に対するテモゾロミドによる治療成績. 第 38 回ニューロオンコロジーの会, 東京, 2009.12.5

安達淳一, 脇谷健司, 三島一彦, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 松谷雅生, 西川 亮: 再発悪性神経膠腫に対する Bevacizumab 及び Irinotecan 併用化学療法の実験. 第 27 回日本脳腫瘍学会, 大阪, 2009.11.8-10

三島一彦, 安達淳一, 脇谷健司, 鈴木智也, 柳澤隆昭, 藤巻高光, 松谷雅生, 西川

亮: 高齢者初発神経膠芽腫に対するテモゾロミド併用放射線療法の治療成績. 第 27 回日本脳腫瘍学会, 大阪, 2009.11.8-10

安達淳一, 脇谷健司, 三島一彦, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 松谷雅生, 西川 亮: 再発悪性神経膠腫に対する Bevacizumab 及び Irinotecan 併用化学療法の実験. 第 27 回日本脳腫瘍学会, 大阪, 2009.11.8-10

21 三島一彦, 脇谷健司, 安達淳一, 鈴木智成, 上宮奈穂子, 福岡講平, 柳澤隆昭, 藤巻高光, 松谷雅生, 西川 亮: 悪性脳腫瘍に対する分子標的治療の現状と展望. 日本脳神経外科学会第 68 回学術総会, 東京, 2009.10.14-16

22 安達 淳一, 脇谷 健司, 三島 一彦, 鈴木智成, 柳澤 隆昭, 松谷 雅生, 西川 亮: 再発悪性神経膠腫に対する Bevacizumab + Irinotecan 併用化学療法. 第 68 回日本脳神経外科学会学術総会, 東京, 2009.10.14-16

23 Mishima K: "Chemo-Immunotherapy with Osmotic Blood-Brain Barrier Opening for Recurrent or Refractory Primary CNS Lymphoma" 8th Cerebral vascular biology international conference. Sendai, Japan, 2009.6.29-7.2

24 Adachi J, Totake K, Mishima K, Wakiya K, Suzuki T, Yanagisawa T, Matsutani M, Nishikawa R: Methylation-sensitive high resolution melting analysis: a new quantitative assessment of MGMT promoter methylation in gliomas. The 3rd World Federation of Neuro-Oncology, Yokohama, 2009.5.11-14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三島 一彦 (MISHIMA KAZUHIKO)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00282640

(2) 研究分担者

安達 淳一 (ADACHI JUNICHI)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70291143