

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 4 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791224

研究課題名（和文）発がん過程に着目した GBM の治療感受性に関する分子生物学的検討

研究課題名（英文）Molecular biological research on the sensitivity for the treatment of GBM focused on the carcinogenic process

研究代表者

橋本 弥一郎（HASHIMOTO YAICHIRO）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20385420

研究成果の概要（和文）：

発がんに関する遺伝学的背景の違いから、GBM を primary と secondary の 2 群に分類し、それぞれの化学放射線治療の感受性を明らかにすることで、治療法の選択にフィードバックが出来るのではないかと考えた。各群を含む種々の培養細胞株を用いて、放射線治療に対する感受性の評価を行ない、両群間で放射線感受性に差異を確認しつつ、感受性の違いにアポトーシスの多寡が起因しているかどうかを確認しているところである。

研究成果の概要（英文）：

We focused on the difference of genetic background on the carcinogenic of GBM. First, in order to make it clear the each sensitivity of the chemoradiotherapy, we divided into two groups of secondary and primary. Then we used a variety of cultured cell lines, including each group, and evaluated the sensitivity to radiotherapy, and tried to confirm the differences in radiation sensitivity between the two groups. Finally we tried to determine whether the hawk of apoptosis has been attributed to differences in sensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、放射線科学

キーワード：放射線腫瘍学、膠芽腫、放射線治療、発がん過程、分子生物学、テモゾロマイド

1. 研究開始当初の背景

多形膠芽腫 Glioblastoma Multiforme (GBM) は、脳腫瘍の中で最も悪性度の高い腫瘍であり、浸潤性で増殖速度も早く、生存期間中央値は1年前後と極めて予後不良な疾患である。現時点でのGBMに対する標準的な治療は、障害を残さない範囲での最大限の外科手術に引き続き、ニトロソウレア剤などの化学療法剤に放射線治療を併用したものであるが、これらの積極的な集学的治療にもかかわらず、30年前と比較しても生存期間がわずかに延長しているにすぎない。近年、GBMに対する補助療法としてテモゾロマイド Temozolomide (TMZ) を投与した第II相研究でTMZに放射線治療を組み合わせることで期待の持てる結果が示され、TMZによる化学放射線同時併用療法のうち、維持療法を受けた患者は、放射線治療のみを受けた患者よりも有意に長く生存したと報告 (New England Journal of Medicine. 2005;352:987-996) された。また、長期間追跡調査においても同様の結果が報告 (Lancet Oncology 2009; on March 9.) され、GBMに対する今後の標準治療として期待されている。

GBMの発がんに関しては、他の多くの悪性腫瘍と同様、多種類の遺伝子異常の集積によって発生すると考えられているが、primary GBMとsecondary GBMでは遺伝子異常のパターンに明らかな違いがあると言われている。今までの報告によるとprimary GBMではEGFRの変異を中心に発がんを起こしていき、secondary GBMでは肺癌などと同様にp53の変異を中心に起こしていくことが予想される。これらの腫瘍細胞の遺伝的背景の違いにより、primary GBMとsecondary GBMの間にTMZの放射線増感の分子生物学的なメカニズムが異なる可能性があるかと推測される。した

がって、TMZの放射線増感に関して、アポトーシスを中心としたメカニズムを解明するためには、p53を軸とした最も古典的なアポトーシスのシグナル伝達経路とMitogen-activated protein kinases (MAPKs)の中でアポトーシスを制御しているシグナル伝達経路を中心に検討していく。さらに、TMZと放射線治療併用時に関与するアポトーシス以外のシグナル伝達経路として、細胞周期関連因子、DNA修復因子の発現の多寡を検討し、GBMに対するTMZ併用の化学放射線治療における先行指標の検索を試みる。

2. 研究の目的

GBMの新たな治療法を開発するきっかけを創るための分子生物学的な基礎研究である。発がんに関する遺伝学的背景の違いから、GBMをprimaryとsecondaryの2群に分類し、それぞれの化学放射線治療の感受性を明らかにすることで、治療法の選択にフィードバックが出来ることを最終目的とした。

3. 研究の方法

各種培養細胞株 (p53 status やEGFR発現増強が異なるもの、MGMT遺伝子プロモーターのメチル化の有無など) を用いて、TMZと放射線治療による感受性の変化をクロノゲニックアッセイあるいはMTT assayで評価する。さらに、TMZと放射線治療併用時の増感作用がどのような細胞死によるものかを確認するために、TMZと放射線照射併用後のアポトーシスの定量的あるいは半定量的な評価を加える。

各種培養細胞株を用いて、TMZと放射線治療併用後のアポトーシスに頻度に関する経時的変化についてレーザースキャニングサイトメーターで検討する。また、p53を中心とした細胞周期関連因子の併用処理後の変

化とそれに引き続く細胞周期の変化についてもレーザースキャニングサイトメーターで検討する。

TMZ の放射線増感効果に関しては、p53 status や EGFR 発現増強、あるいは MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化の有無との関係について検討する。

GBM に対する術後の化学放射線治療に関して、治療効果と発がんの遺伝子異常の背景の違いを徐々に解明していく。

アポトーシス誘導に差異が認められた場合には、アポトーシス関連のシグナル因子の解析を中心に行い。特に古典的なアポトーシスの経路である p53 を中心としたシグナル伝達経路ならびに MAPK family に属する JNK などのシグナル伝達経路を主として検討する。関連する因子がタンパク発現で評価可能な場合には、immunoblot analysis を用いて評価を行い、リン酸化などの酵素活性の測定が必要な場合には、免疫沈降電気泳動法やルシフェラーゼアッセイを用いて評価する。アポトーシスの多寡に差異を認めなかった場合には、p53 のシグナル伝達と関係している p21 や CDK などの細胞周期関連因子ならびに MAPK family に属する p38MAPKKK などに関連したシグナル因子の経時的変化について検討する。また、シグナル因子に経時的変化についても、細胞周期の変化とともにレーザースキャニングサイトメーターを用いて評価する。細胞周期やアポトーシスと関連が乏しいと判断された場合は、DNA 修復に関わる DNA-PKcs、Ku70/80、Rad54 の TMZ と放射線照射併用後の発現変化についてタンパクやリン酸化を主として検討する。

4. 研究成果

昨年から各群を含む種々の培養細胞株を用いて、放射線治療に対する感受性の評価を行なっている。両群間で放射線感受性に差異

を確認しつつ、感受性の違いにアポトーシスの多寡が起因しているかどうかを確認しているが、はっきりした結論は得られていない。また、アポトーシスや細胞周期に関連したシグナル因子の経時的変化の推移を定量的あるいは半定量的に評価しているが、こちらに関しても、明確な答えが得られていない状況である。仮にこれらに関連が見いだせれば、2 群間での治療方針が変わってくることが示唆される。逆にアポトーシスや細胞周期に関連が乏しいと判断された場合は、DNA 修復に関わる DNA-PKcs、Ku70/80、Rad54 の TMZ と放射線照射後の発現変化についてタンパクやリン酸化を主とした検討が必要であると考えている。

一方で、当院で 2009 年 1 月から 2010 年 12 月の間に GBM に対して術後放射線治療を行った 50 例を対象として後方視的に研究している。症例の内訳は、Primary GBM が 43 例、secondary GBM が 7 例、男性 32 例、女性 18 例、年齢の中央値は、55.6 歳（範囲 3.9 歳から 77.4 歳）、観察期間の中央値は、13.3 ヶ月（範囲 2.7~53.3 ヶ月）であった。現在、TMZ の放射線増感効果を解明するために、p53 status や EGFR 発現増強、あるいは MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化の有無との関係について検討しているところである。

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）

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 橋本弥一郎、山崎宙士 等、上咽頭癌に対する化学放射線治療後に Dropped Head Syndrome を呈した一例、第 440 回日本医学放射線学会関東地方会定期大会、2011. 12. 10
- ② 前林勝也、橋本弥一郎 等、星細胞腫-乏突起膠腫系の退形成性神経膠腫瘍（WHO Grade3）の治療成績、日本放射線腫瘍学会第 23 回学術大会、2010. 11. 19

- ③ 清塚 誠, 秋元 哲夫, 福留 美夏, 茂木 厚 ,
橋本 弥一郎 等, C225 による放射線感
受性増感作用における EGFR 核移行阻害
と DNA 損傷修復過程修飾の関与, 日本放
射線腫瘍学会第 23 回学術大会,
2010. 11. 19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 弥一郎 (HASHIMOTO YAICHIRO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20385420