

令和 7 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K09290

研究課題名（和文）悪性神経膠腫におけるテモゾロミド耐性獲得においてオートファジーが果たす役割の解明

研究課題名（英文）Clarification of the role of autophagy in the acquisition of temozolomide resistance in malignant gliomas.

研究代表者

米澤 大（YONEZAWA, Hajime）

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：50550076

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：TMZ暴露後のU251では、ウェスタンブロットにおいてautophagyの指標であるLC3B-の上昇と、それに引き続くcleaved caspase3の出現がみられたが、TMZ耐性株（U251/TMZ-R）ではいずれも見られなかった。しかし、TMZとautophagosomeとlysosomeの融合阻害剤であるBaA1を併用して同様の検討を行った結果、両細胞株において見られ、さらにU251/TMZ-RでTMZ耐性度の低下がもたらされた。一連の結果より、U251/TMZ-Rはautophagosomeの分解に長けており、そのことがTMZ耐性獲得に関与している可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

autophagyの分子機構が明らかとされてきたのは近年であり、各種glioma cell lineにおいてもTMZを含む各種factorによるautophagy誘導およびその意義に関する知見が盛んに報告されつつある一方で、同一細胞株由来のsubtype間でautophagyの動向を比較検討した報告は皆無である中、今回、TMZ耐性獲得にはautophagosomeの分解促進が関与していることが示唆された。これはTMZ耐性をもつ膠芽腫に対して、TMZとautophagosome分解阻害剤の併用が有効な加療法であると考えられ、新たな意義ある治療法の可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Western blotting showed an increase in LC3B-II, an indicator of autophagy, and the subsequent appearance of cleaved caspase 3 in U251 after TMZ exposure, but none in the TMZ-resistant strain (U251/TMZ-R). However, when TMZ was combined with BaA1, a fusion inhibitor of autophagosomes and lysosomes, similar results were observed in both cell lines, and U251/TMZ-R showed a decrease in TMZ resistance. These results suggest that U251/TMZ-R is a proficient degrader of autophagosomes, which may be involved in the acquisition of TMZ resistance.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：グリオーマ オートファジー テモゾロミド 耐性機序

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

glioblastomaをはじめとする glioma は、脳腫瘍の中でも治療困難で予後不良腫瘍の代表格であり、その治療法の確立は、脳神経外科領域における最も関心の高い議題の一つである。現在、temozolomide (TMZ) が、悪性 glioma 標準治療の主を担っているが、TMZ 治療経過中に再発増悪を来たす症例および元より TMZ 耐性を有する症例が少なからず存在し、その治療成績も決して満足されるものではない。TMZ 耐性 glioma 細胞集団の制御が glioma 治療において極めて重要である。

TMZ耐性機序としては、DNA修復酵素であるO6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の発現が知られている。しかし、MGMT非発現群においても、全生存期間中央値は21.7ヶ月に留まっており、TMZ投与中にMGMT以外の耐性機序を獲得すると考えられる。

近年注目を浴びているautophagyが、TMZにて誘導されるとの報告を認知し、また、autophagyを阻害することで、TMZによる抗腫瘍効果が高められたとの報告があるが (Kanzawa T et al., 2004, Buccarelli M et al., 2018)、autophagyがcytoprotectiveな機構であるのか、cytotoxicな機構であるのかを明快に証明するには至っていないと考えた。樹立したTMZ耐性株におけるTMZとautophagy阻害薬を用いた予備実験において興味深い知見が得られたため、この疑問の解明の可能性が十分に高いと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、glioma cell line より作製樹立した TMZ 耐性株を用いて、近年急速にその分子機構が明らかにされつつある autophagy の動向に着目し、TMZ 耐性獲得機序を解明、さらには、耐性 glioma に対する新しい加療への知見を得ることを目的としている。

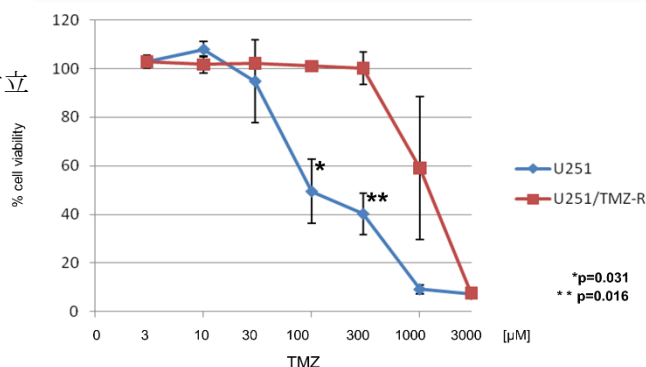
3. 研究の方法

下記4項目の方法で研究および実験を行った。

- (1) テモゾロミド (TMZ) 耐性細胞は、限界希釈法により U251 から単離した。この耐性細胞を U251/TMZ-R 細胞とした。
- (2) U251 と U251/TMZ-R 細胞の LC3B と切断カスパーゼ3タンパク質をウェスタンブロット法で検出した。
- (3) U251 および U251/TMZ-R 細胞の内因性 LC3B のパンクレートシグナルは、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた免疫蛍光分析により検出した。
- (4) U251 および U251/TMZ-R の細胞生存率に対する薬剤の影響を MTT アッセイで評価した。

4. 研究成果

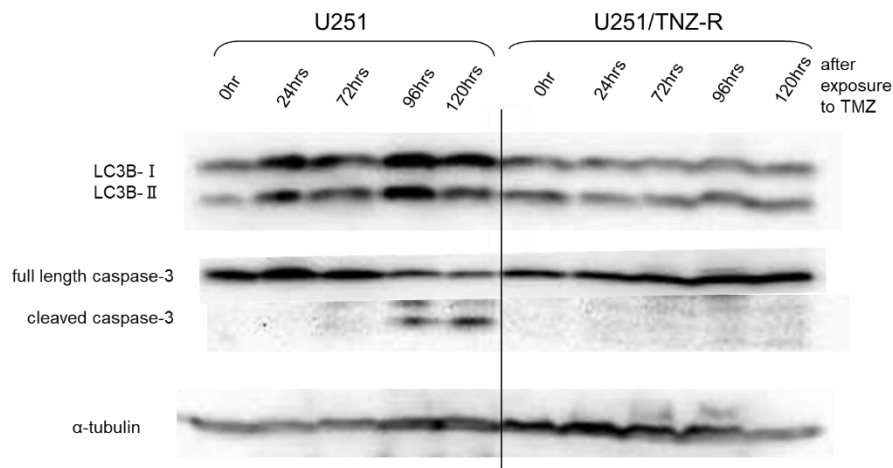
- (1) テモゾロミド (TMZ) 耐性細胞を樹立した。TMZ に対する U251 細胞の感受性は、U251/TMZ-R 細胞よりも有意に高いことが MTT アッセイにより証明された (図1)。



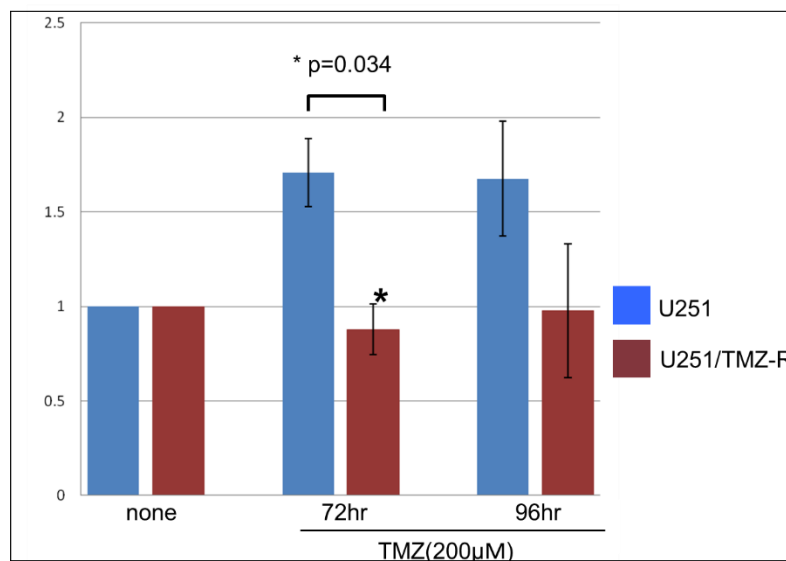
【図1】 Assays were performed 6 days after the exposure to TMZ

(2) U251 においては、TMZ 暴露後 LC3B II の上昇とそれに引き続く cleaved caspase3 の出現がみられたが、U251/TMZ-R においては、LC3B II の上昇も cleaved caspase3 の出現もみられなかった (図 2)。

具体的には、U251 では TMZ 暴露後 72 時間に LC3B II の level が約 1.7 倍に上昇がみられたが、U251/TMZ-R ではみられなかった (図 3)。



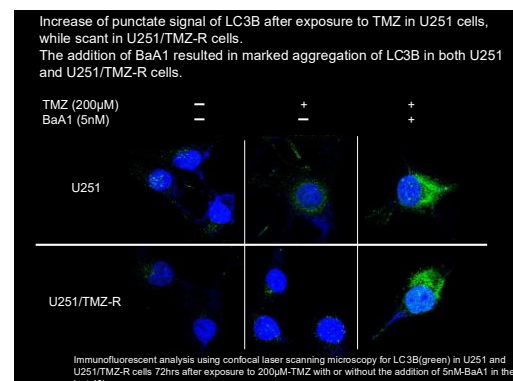
【図 2】 Western blot analysis of LC3B and caspase3 in U251 and U251/TMZ-R cells 0-120 hours after exposure to 200 μ M-TMZ



【図 3】 Relative expression levels of LC3B-II protein normalized by alpha-tubulin. Normalized LC3B-II levels of untreated cells were regarded as 1.0.

(3) LC3B 抗体での共焦点免疫蛍光顕微鏡法でも研究成果②と同様の傾向が観察された (図 4)。

このことは、U251/TMZ-R でも TMZ により autophagy が誘導されるが、autophagosome は速やかに分解されている可能性を示す。

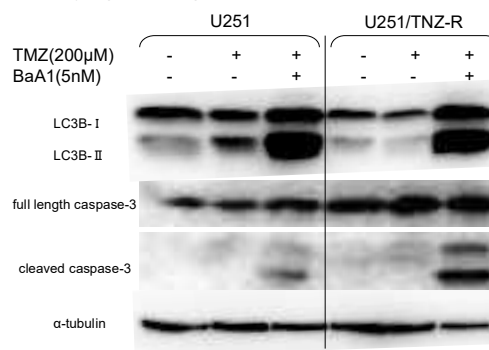


【図 4】

(4) LC3B IIの上昇のみでは、それが autophagosome の形成の活性化によるものであるのか、autophagosome の turn over の停滞によるものなのかを判断することができなかったため、TMZ および autophagy を lysosome と autophagosome の fusion の段階で阻害する Bafilomycin A1 (BaA1) の併用により、ウェスタンブロット法および MTT アッセイでさらなる検討を行った。

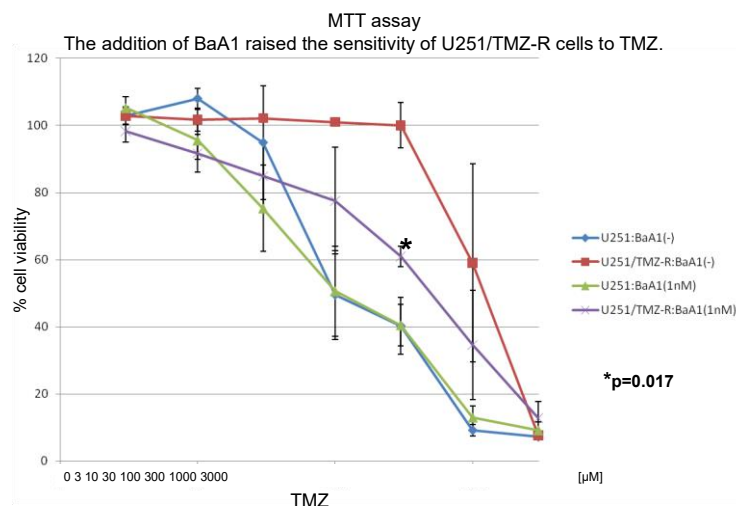
ウェスタンブロット法では BaA1 併用により、両細胞において、同程度の LC3B II レベルの上昇および cleaved caspase3 の出現がみられた (図 5)。

Increased LC3B- II levels were detected in both U251 and U251/TMZ-R cells exposed to TMZ in the addition of BaA1, accompanying cleavage of caspase3.



【図 5】 Western blot analysis of LC3B II and caspase 3 in U251 and U251/TMZ-R cells 72hrs after exposure to 200μM-TMZ with or without the addition of 5nM-BaA1 in the last 48hrs.

また、TMZ 単独における MTT アッセイでは TMZ 耐性株は約 10 倍の耐性を有するが、TMZ と BaA1 併用下での同アッセイでは、耐性株において明らかな生存率の低下が確認された。興味深いことに、BaA1 併用時の生存率の低下は耐性株のみで観察された (図 6)。さらに、共焦点免疫蛍光顕微鏡法でも同様の傾向が観察された (前述 図 4)。



【図 6】 Assays were performed 6 days after the exposure to TMZ with the addition of 1nM-BaA1 in the last 5 days.

U251/TMZ-R において、TMZ 単独ではみられなかった autophagosome の増加が、BaA1 併用時にはみられた。

TMZ 単独では cleaved caspase-3 は U251 のみで見られたのに対し、BaA1 併用では両者においてみられ、さらに U251/TMZ-R では TMZ 耐性度の低下がもたらされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	比嘉 那優大 (HIGA Nayuta) (90792200)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究分担者	内田 裕之 (UCHIDA Hiroyuki) (80404482)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・特任助教 (17701)	
研究分担者	吉本 幸司 (YOSHIMOTO Koji) (70444784)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	高城 朋子 (TAKAJO Tomoko) (50972345)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任研究員 (17701)	

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