

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791585

研究課題名（和文） グリオーマ幹細胞の MGMT 発現における MAPK 経路の役割

研究課題名（英文） Role of the MAPK pathway in the MGMT expression of glioma stem cells

研究代表者

佐藤 篤 (SATO ATSUSHI)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30455901

研究成果の概要（和文）：

グリオブラストーマの治療ではアルキル化剤である temozolomide (以下 TMZ と略す) が用いられているが、グリオーマ幹細胞では TMZ 耐性を与える DNA 修復酵素の O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (以下 MGMT と略す) が高発現しているため、TMZ 治療後も残存し再発につながると考えられている。本研究では 1)MEK あるいは MDM2 を阻害により p53 依存的に MGMT の発現が低下すること、2)MEK 阻害剤と TMZ の併用によって単剤投与よりも有意に細胞死が増強すること、3)マウス頭蓋内腫瘍モデルにおいて MEK 阻害剤と TMZ の併用で単剤投与よりも生存期間が有意に延長することを確認した。

本研究の成果は、難治性腫瘍の一つであるグリオブラストーマに対して MEK-ERK-MDM2-p53 経路が新たな治療ターゲットとなる可能性の有効性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

The gene encoding O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), which removes the methyl group attached by temozolomide, is often silenced by promoter methylation in glioblastoma but is nevertheless expressed in a significant fraction of cases and is therefore regarded as one of the most clinically relevant mechanisms of resistance against temozolomide. This study provide lines of evidence that the MEK-ERK-MDM2-p53 pathway plays a critical role in the regulation of MGMT expression, using stem-like glioblastoma cells. This study show that, MEK inhibition reduced MDM2 expression and that inhibition of either MEK or MDM2 resulted in p53 activation accompanied by p53-dependent downregulation of MGMT expression. MEK inhibition rendered otherwise resistant stem-like glioblastoma cells sensitive to temozolomide, and combination of MEK inhibitor and temozolomide treatments effectively deprived stem-like glioblastoma cells of their tumorigenic potential. This findings suggest that targeting of the MEK-ERK-MDM2-p53 pathway in combination with temozolomide could be a novel and promising therapeutic strategy in the treatment of glioblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：グリオーマ、腫瘍幹細胞、
薬剤耐性、化学療法

1. 研究開始当初の背景

グリオーマ幹細胞は非幹細胞に比して放射線や化学療法に抵抗性を有しており、治療を行ったとしても死滅させることは困難で、これらの細胞が腫瘍を形成し治療後の再発に重要な役割を果たしていると考えられている。グリオブラストーマにおける temozolomide (以下 TMZ と略す) への抵抗性の一因として DNA 修復酵素の 1 つである O6-methylguanine-DNA methyltransferase (以下 MGMT と略す) が着目されている。MGMT は TMZ による DNA 損傷を修復することで、TMZ の効果を減少させると考えられている。

最近になってグリオーマ幹細胞では非幹細胞に比較して MGMT が高発現しており臨床で使用される TMZ 投与量では死滅させることは困難であることが報告されている (Liu G: Mol Cancer 5, 2006, Blough MD : Neuro-Oncol 12(7), 2010)。

以上のことからグリオーマ幹細胞における MGMT の高発現が TMZ 治療抵抗性の要因の 1 つであると考えられるが、1) MGMT がグリオーマ幹細胞の TMZ 耐性に関与するか、2) グリオーマ幹細胞の MGMT 発現がどのように制御されているか、3) グリオーマ幹細胞における MGMT 発現を効率よく抑制する方法は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究ではグリオーマ幹細胞の MGMT 発現制御における MAPK 経路の役割について検討するとともに、MAPK 経路阻害剤と TMZ の併用により、グリオーマ幹細胞を効率よく殺傷し長期生存を可能にする脳腫瘍治療モデルの確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) MGMT 発現抑制による TMZ 感受性の変化の検討

グリオーマ幹細胞では MGMT 以外にも、DNA 修復能や薬剤排泄能が高いことが報告されている。そのため、MGMT の発現を抑制することで細胞死が増強されるか確認する必要がある。そこで RNA 干渉法 (以下 siRNA と略す) を用いて MGMT の発現を減少させることで、TMZ による細胞死が増加するか propidium iodide (以下 PI と略す) を用いて細胞死を定量化し検討を行った。

(2) MEK 阻害による MGMT 発現の変化の検討

MEK 経路による MGMT の発現への影響を検討するために、MEK 阻害剤である SL327 の投与によって MGMT の発現が変化するか Western blot 法を用いて検討を行った。また薬理的阻

害はしばしば非特異的作用が見られるので、MEK 阻害で見られた効果が確かに MEK 阻害によるものか確認する必要がある。そこで、MGMT 発現低下の特異性を確認するために特異性が全く異なった方法論、すなわち siRNA を用いて MEK をノックダウンし MGMT の発現が減少するか検討を行った。その効果が種々のグリオーマ幹細胞において共通に認められる現象か確認するため、当研究室で樹立したグリオーマ幹細胞 (2 種類) に加えて東京大学脳神経外科より供与されたグリオーマ幹細胞 TGS01、TGS04 を用い検討を行った。

(3) MEK 阻害による TMZ 感受性の変化の検討

MGMT の発現を MEK 阻害剤を用いて減少させた後に TMZ を投与し、細胞死の変化を propidium iodide を用いて細胞死を定量化し検討を行った。また、ヌードマウス頭蓋内腫瘍モデルを用いて生存期間延長効果についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) MGMT 発現抑制による TMZ 感受性の変化の検討

グリオーマ幹細胞の MGMT 発現を siRNA を用いて減少させることで、グリオーマ幹細胞の TMZ による細胞死が増加することが確認された (図 1, 2)。

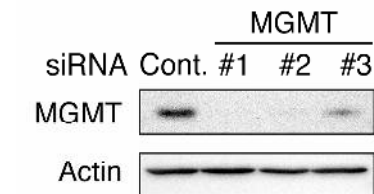


図 1 siRNA による MGMT の抑制

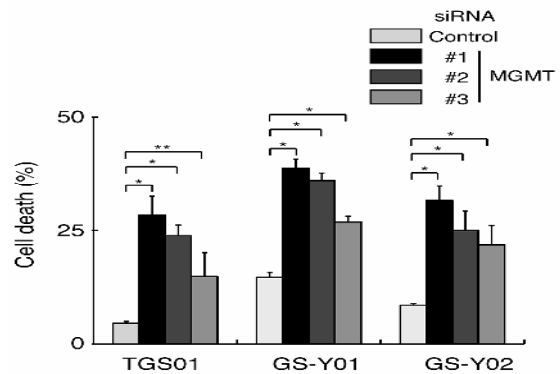


図 2 siRNA を用いた MGMT の抑制による細胞死の変化

(2) MEK 阻害による MGMT 発現の変化の検討

グリオーマ幹細胞を SL327 存在下で培養すると、Erk のリン酸化が抑制されるとともに、MGMT の発現が減少した。同様に siRNA で MEK

をノックダウンすることでMGMTの発現が減少することが確認された(図3)。



図3 MEK阻害によるMGMT発現の抑制

(3)MEK阻害によるTMZ感受性の変化の検討
MGMTの発現をMEK阻害剤を用いて減少させた後にTMZを投与することで、TMZ単剤よりも有意に細胞死が増加することが確認された(図4)。

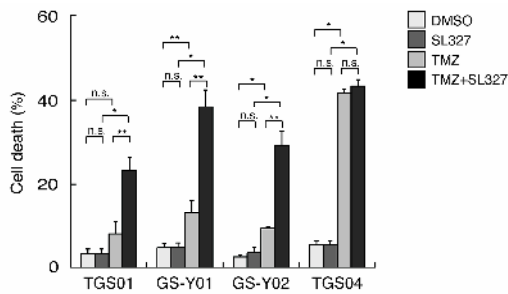


図4 MEK阻害剤によるTMZ抵抗性の改善

(4)頭蓋内腫瘍モデルを用いた併用療法の効果の検討
頭蓋内腫瘍モデルを用いて、MEK阻害剤のTMZの治療効果への影響を検討した。結果、MEK阻害剤を併用することでTMZ単剤よりも有意に生存期間が延長した(図5)。

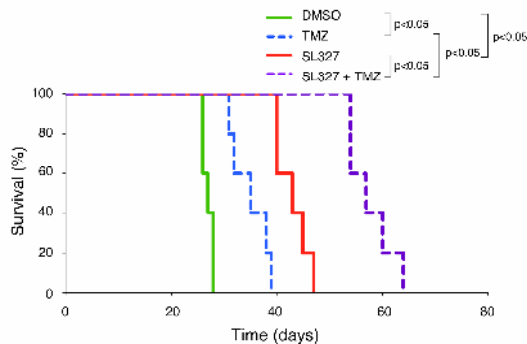


図5 MEK阻害剤とTMZ併用による造腫瘍能の抑制

(5)MEK阻害によるMGMT抑制の分子メカニズムの検討

MEK阻害によりMRMTの発現が抑制されることが明らかになった。そこで、MGMT発現制御の分子メカニズムについて検討を行った。MGMTはp53により抑制的に制御させることが報告されている。MEK阻害によってp53の

抑制因子であるMDM2の発現が抑制され、結果p53の発現が上昇することが明らかになった。また、MEK阻害剤によるMGMT抑制はp53依存的事であることが確認された(図6)。さらに、Nutlin-3あるいはsiRNAを用いてMDM2を直接阻害することでもp53依存的にMGMT発現が抑制されることが明らかになった(図7)。

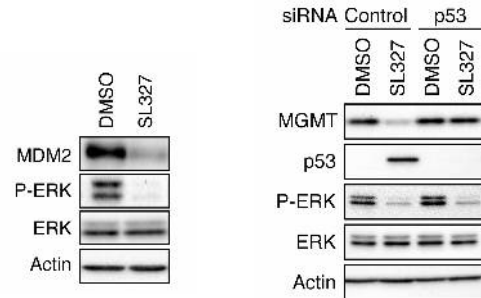


図6 MEK阻害剤によるMDM2-p53経路を介したMGMT発現の制御

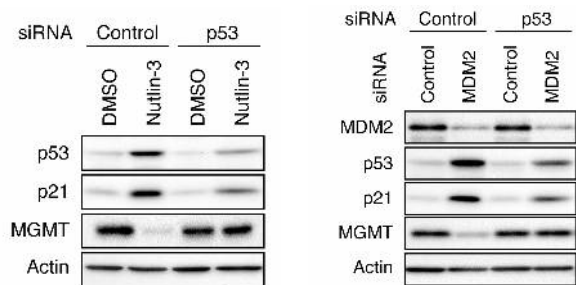


図7 MDM2阻害によるMGMT発現の制御

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4件)

1, Sato A, Sunayama J, Okada M, et al;

Glioma-Initiating Cell Elimination by

Metformin Activation of FOXO3 via AMPK.

Stem Cells Transl Med.2012Nov;1(11):811-24.

doi:10.5966/sctm.2012-0058 (査読あり)

2, Matsuda K, Sato A, Okada M, et al;

Targeting JNK for therapeutic depletion of stem-like glioblastoma cells.

Sci Rep. 2012;2:516.

doi: 10.1038/srep00516. (査読あり)

3, Sato A, Sunayama J, Matsuda K, et al;
MEK-ERK Signaling Dictates DNA-Repair
Gene MGMT Expression and Temozolomide
Resistance of Stem-Like Glioblastoma Cells
via the MDM2-p53 Axis.

Stem Cells. 2011 Dec;29(12):1942-51.

doi: 10.1002/stem.753. (査読あり)

4, Sunayama J, Sato A, Matsuda K, et al;
FoxO3a functions as a key integrator of cellular
signals that control glioblastoma stem-like cell
differentiation and tumorigenicity.

Stem Cells. 2011 Sep;29(9):1327-37.

doi: 10.1002/stem.696. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

- 1, 佐藤 篤: グリオーマ幹細胞制御における
JNKの役割とその治療標的としての意義
第30回日本脳腫瘍学会、グランドプリンス
ホテル広島 (広島)、2012年11月27日
- 2, 佐藤 篤: グリオーマ幹細胞における分化
誘導因子FOXO3をターゲットとした治療
法の開発
第71回日本脳神経外科学会総会、大阪国際
会議場 (大阪)、2012年10月17日
- 3, 佐藤 篤: グリオーマ幹細胞における
FoxO3aを介した分化と造腫瘍能の制御
第29回日本脳腫瘍学会、下呂温泉水明館
(岐阜)、2011年11月27日
- 4, 佐藤 篤: グリオーマ幹細胞における
MGMT発現制御の分子機構に関する検討
第12回日本分子脳神経外科学会、パシフィ
コ横浜 (横浜)、2011年10月15日
- 5, 佐藤 篤: MEK経路阻害によるMGMT発現
およびテモゾロミド感受性に関する検討
第70回日本脳神経外科学会総会、パシフィ
コ横浜 (横浜)、2011年10月12日

6, 佐藤 篤: MEK inhibition enhanced
temozolomide treatment of glioma stem cells
via MGMT down-regulation

第70回日本癌学会総会、名古屋国際会議場
(名古屋)、2011年10月3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 篤 (SATO ATSUSHI)

山形大学 医学部 非常勤講師

研究者番号 : 30455901